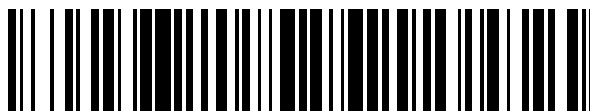


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 216**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 19/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010** **E 10798096 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2516637**

54 Título: **Combinación de biocatalizadores termoestables para la síntesis de nucleósidos**

30 Prioridad:

22.12.2009 EP 09382296

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.09.2016

73 Titular/es:

PLASMIA BIOTECH, S.L. (100.0%)
C/ Temple, 15-19 1r 1a
08911 Badalona, Barcelona, ES

72 Inventor/es:

MONTILLA AREVALO, RAFAEL;
DERONCELÉ THOMAS, VÍCTOR MANUEL;
LÓPEZ GÓMEZ, CRISTINA;
PASCUAL GILABERT, MARTA;
ESTÉVEZ COMPANYY, CARLOS y
CASTELLS BOLIART, JOSEP

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 582 216 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Combinación de biocatalizadores termoestables para la síntesis de nucleósidos

5 **Campo de la invención**

La invención pertenece al campo de la biotecnología.

10 **Antecedentes de la invención**

10 Los (desoxi)nucleósidos son glicosilaminas que consisten en una base de tipo purina o pirimidina unida a una azúcar de ribosa o desoxirribosa, ésta última siendo pentosas cíclicas. Algunos ejemplos incluyen: citidina, uridina, adenosina, guanosina, timidina e inosina. Los análogos de nucleósidos han sido extensivamente usados como agentes antivirales y anticancerosos dada su capacidad para actuar como inhibidores de la transcriptasa inversa o como terminadores de cadena en las síntesis de ARN o ADN [1].

15 Se han conseguido síntesis químicas estereoselectivas de análogos de nucleósidos pero usando reactivos caros o contaminantes [2] y que implican procesos con múltiples pasos que suponen un mayor consumo de tiempo. Los procedimientos biocatalíticos ofrecen una excelente alternativa a la síntesis química de nucleósidos ya que las reacciones biocatalizadas son regioselectivas y estereoselectivas y suponen una disminución del contenido de subproductos de reacción. De particular interés entre los procedimientos biocatalíticos se encuentra la reacción de transglicosilación enzimática entre un nucleósido donador de azúcar y una base aceptora mediante enzimas que catalizan las reacciones reversibles generales [3], tal como se representa en las figuras 1 y 2.

20 Las nucleósido fosforilasas son transferasas ampliamente distribuidas en células de mamífero y bacterias y juegan un papel central en la ruta de salvataje del metabolismo nucleosídico. Son bifuncionales. Por un lado, catalizan la escisión reversible del enlace glicosídico de los ribonucleósidos o desoxirribonucleósidos en presencia de fostato inorgánico para generar la base y la ribosa-1-fosfato o desoxirribosa-1-fosfato. Estas reacciones que emplean las purina nucleósido fosforilasas y las pirimidina nucleósido fosforilasa se muestran en la figura 1. Por otro lado, estas enzimas pueden catalizar la transferencia de pentosas dependiente de fosfato entre bases púricas o pirimidínicas y nucleósidos, es decir, reacciones de transglicosilación, para producir nucleósidos con diferentes bases. La figura 2 muestra un ejemplo de la síntesis en un solo paso sintético utilizando nucleósido fosforilasas.

25 Cuando se combinan las purina nucleósido fosforilasas y las pirimidina nucleósido fosforilasas es posible transferir el azúcar de un nucleósido pirimidínico donador a una base aceptora púrica o pirimidínica, así como de una nucleósido púrico donador a una base aceptora púrica o pirimidínica, dependiendo de los materiales de partida utilizados [4]. Como consecuencia, las nucleósido fosforilasas de diferentes fuentes, especialmente bacterianas, han sido explotadas como herramientas para la síntesis enzimática de análogos de nucleósidos.

30 En la naturaleza estas enzimas han sido descritas en varias cepas microbianas, en particular en bacterias termófilas (es decir, bacterias que florecen a temperaturas entre 45°C y 80°C), que han sido usadas como fuentes de nucleósido fosforilasas en numerosos trabajos encaminados a la obtención de nucleósidos modificados por transglicosilación enzimática. Sin embargo, a pesar de que en estos estudios los rendimientos de los productos diana eran suficientemente elevados, la cantidad o proporción de las actividades enzimáticas necesarias para llevar a cabo la transglicosilación no eran óptimas [5]. Requerían una extensión de los tiempos de reacción (hasta varios días) o un incremento de las cantidades de biomasa bacteriana utilizadas para conseguir el grado de transformación deseado.

35 Además, cuando se desarrolla un proceso de transglicosilación se plantea otro problema: la difícil solubilización de grandes cantidades de sustratos y productos, muchos de ellos poco solubles en medios acuosos a temperatura ambiente. Aunque este problema podría resolverse utilizando temperaturas más altas, se necesitarían enzimas suficientemente estables en estas duras condiciones de reacción.

40 Las arqueas son un grupo de microorganismos unicelulares que son uno de los tres dominios de la vida; los otros son bacteria y eucariotas. Se llamaron anteriormente arqueobacterias bajo el taxón de las bacterias, pero ahora se consideran por separado y distintas. El dominio de arquea se divide actualmente en dos filos principales, el Euryarchaeota y Crenarchaeota. El Euryarchaeota incluye una mezcla de metanógenos, halófilos extremos, termoacidófilos, y algunos hipertermófilos. Por el contrario, la Crenarchaeota incluye sólo hipertermófilos. Los hipertermófilos son aquellos organismos que prosperan en ambientes extremadamente calientes, desde 60°C hacia arriba, de manera óptima por encima de 80°C.

45 Cacciapuoti et al. [6-8] describen dos purina nucleósido fosforilasas (PNPasas) de arqueas hipertermófilas, en particular, da a conocer las enzimas 5'-desoxi-5'-metiltioadenosina fosforilasa II (SsMTAPII, EC 2.4.2.28) de *Sulfolobus solfataricus*, y purina nucleósido fosforilasa (PfPNP) de *Pyrococcus furiosus*. La enzima de *Pyrococcus furiosus* se denominó en primer lugar como MTAPII, pero se renombró a PNP, ya que no es capaz de escindir la

metiltioadenosina. *Sulfolobus solfataricus* pertenece a Crenarchaeota, mientras que *Pyrococcus furiosus* pertenece a Euryarchaeota. El código EC anterior es la nomenclatura convencional de enzimas proporcionada por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular que clasifica las enzimas por las reacciones que catalizan.

5 La mayoría de las enzimas caracterizadas a partir de hipertermófilas son óptimamente activas a temperaturas cercanas a la temperatura óptima de crecimiento del organismo huésped. Cuando se clonan y expresan en huéspedes mesófilos, como *Escherichia coli*, las enzimas hipertermófilas generalmente retienen sus propiedades térmicas. A veces, las enzimas son óptimamente activas a temperaturas muy por encima de la temperatura óptima de crecimiento del organismo huésped [9]. Otras veces se han descrito enzimas que son óptimamente activas de
10 10°C a 20°C por debajo de la temperatura óptima de crecimiento del organismo [10-11]. Sin embargo, la 5'-metiltioadenosina fosforilasa de *Sulfolobus solfataricus* (una enzima hexamérica que contiene seis puentes disulfuro entre subunidades), cuando se expresa en un huésped mesófilo, forma puentes disulfuro incorrectos y es menos estable y menos termófilo que la enzima nativa [12].

15 Thermoprotei son una clase hipertermófila de Crenarchaeota. A partir de los genomas secuenciados y disponibles para la clase de arqueas Thermoprotei, sólo se hallaron tres secuencias para purina nucleósido fosforilasa (EC 2.4.2.1) y tres secuencias para la uridina fosforilasa (EC 2.4.2.3). Estas seis proteínas se han introducido, respectivamente, en UniProtKB/TrEMBL con los números de acceso: A1RW90 (A1RW90_THEPD), para la proteína hipotética de *Thermofilum pendens* (cepa Hrk 5); Q97Y30 (Q97Y30_SULSO), para la proteína hipotética de
20 *Sulfolobus solfataricus*; A3DME1 (A3DME1_STAMF), para la proteína hipotética de *Staphylothermus marinus* (cepa ATCC 43588/DSM 3639/F1); Q9YA34 (Q9YA34_AERPE), para la proteína hipotética de *Aeropyrum pernix*; A2BJ06 (A2BJ06_HYPBU) para la proteína hipotética de *Hyperthermus butylicus* (cepa DSM 5456/JCM 9403); y D9PZN7 (D9PZN7_ACIS3) para la proteína hipotética de *Acidilobus saccharovorans* (cepa DSM 16705/VKM B-2471/345-15). Todas estas secuencias estaban en el estado de anotación de no revisadas, lo que significa que su presencia en las
25 arqueas sólo ha sido verificada por ordenador.

A pesar de que muchos genes se pueden expresar con éxito en *Escherichia coli* a altos rendimientos, varias proteínas de hipertermófilas se expresan poco o nada, en parte debido al uso de codones raros. De hecho, y según nuestro conocimiento, nadie ha conseguido con éxito la expresión de alguno de los genes mencionados
30 anteriormente.

En vista de los prejuicios anteriores, y en vista de las dificultades técnicas, los inventores inesperadamente fueron capaces de preparar vectores recombinantes viables y, de manera destacada, de obtener fosforilasas recombinantes que eran óptimamente activas a temperaturas superiores a 60°C. Los catalizadores termoestables y químicamente estables de la presente invención son una purina nucleósido fosforilasa (PNPasa, EC 2.4.2.1), y una uridina fosforilasa (UPasa, EC 2.4.2.3), procedentes de la clase de arqueas Thermoprotei, en el que la PNPasa es de
35 *Sulfolobus solfataricus* (SEQ ID. NO 7) y la UPasa es de *Aeropyrum pernix* (SEQ ID. NO 8).

En particular, se ha encontrado sorprendentemente que las nucleósido fosforilasas recombinantes derivadas de Thermoprotei hipertermófilas tienen propiedades de estructura-función únicas, tales como una termoestabilidad mejorada, alta eficiencia catalítica y actividades enzimáticas óptimas a temperaturas cercanas o superiores a 100°C. Estas enzimas recombinantes se pueden usar ventajosamente para las reacciones de transglicosilación, en forma de lisado de células y en forma de extractos en bruto o purificados, para la producción industrial de análogos de nucleósidos naturales y modificados. En particular, son versátiles, ya que pueden catalizar transglicosilaciones en
40 medios acuosos, en disolventes orgánicos, a temperaturas entre 60°C y 120°C, o en una combinación de estos parámetros, lo que permite la preparación de muchos y diversos tipos de nucleósidos a rendimientos de producción y tiempos de reacción aceptables, y empleando cantidades económicas de las enzimas. Es importante destacar que los biocatalizadores descritos en la presente invención se pueden utilizar para reacciones de bioconversión que requieren la presencia de disolventes orgánicos, temperaturas por encima de 60°C, o ambos, con el fin de solubilizar los sustratos o los productos de reacción. Estas fosforilasas son ideales en reacciones con sustratos insolubles en agua. Otra ventaja de estas fosforilasas reside en su tolerancia a los disolventes orgánicos, y en que se pueden reutilizar para varios ciclos de reacción.
45

Más ventajosamente, la invención ofrece una combinación de nucleósido fosforilasas de *Thermoprotei* que es útil para la síntesis "one-pot" de nucleósidos. Las enzimas se pueden utilizar para producir nucleósidos naturales o análogos en una sola etapa (one-pot) o con procedimientos de síntesis de dos etapas. En la síntesis de una sola etapa, se utilizan una pirimidina nucleósido fosforilasa y una purina nucleósido fosforilasa en el mismo lote con el fin de cambiar la base ligada al azúcar por otra de elección. En el de dos etapas, se utiliza una pirimidina nucleósido fosforilasa para la liberación del azúcar de un nucleósido de pirimidina y, a continuación, se aísla el azúcar 1-fosfato
50 y más tarde, en otro recipiente, se liga una base de purina al azúcar usando una purina nucleósido fosforilasa.
60

Taran S A et al., "Enzymatic transglycosylation of natural and modified nucleosides by immobilized thermostable nucleoside phosphorylases from *Geobacillus stearothermophilus*", Russian Journal of Bioorganic Chemistry, vol. 35, No. 6, 6 Noviembre 2009, páginas 739-745, da a conocer la transglicosilación enzimática de nucleósidos naturales y

modificados por nucleósido fosforilasas inmovilizadas termoestables de *Geobacillus stearothermophilus*: purina nucleósido fosforilasa II (E. C. 2.4.2.1) y pirimidina nucleósido fosforilasa (E. C. 2.4.2.2).

- 5 Trelles J A et al., "Screening of Catalytically active microorganisms for the synthesis of 6-modified purine nucleosides", *Biotechnology Letters*, Kluwer Academic Publishers, DO LNKD-DOI: 10.1007/S10529-005-5628-7, vol. 27, no. 11, 1 junio 2005, páginas 759-763 da a conocer un procedimiento de cribado para encontrar actividad de transglicosilación en microorganismos para la síntesis de nucleósidos de purina modificados en 6.
- 10 Kawarabayashi Yutaka et al. "Complete genome sequence of an aerobic hyperthermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1", *DNA Research*, Universal Academy Press, JP LNKD-DOI:10.1093/DNARES/6.2.83., vol 6, no. 2, 1 enero 1999, páginas 83-101, da a conocer una uridine fosforilasa de *Aeropyrum pernix*.
- 15 Hamamoto Tomoki et al. "Cloning of purine nucleoside phosphorylase II gene from *Bacillus stearothermophilus* TH 6-2 and characterization of its gene product", *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, vol. 61, no. 2, 1997, páginas 276-280, da a conocer el proceso de clonación y secuenciación de Pu-NPasa II de la cepa TH 6-2 de *Bacillus stearothermophilus*. La Pu-NPasa se purificó y caracterizó.
- 20 Hamamoto Tomoki et al. "Cloning and expression of purine nucleoside phosphorylase I gene from *Bacillus stearothermophilus* TH 6-2", *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, vol. 61, no. 2, 1997, páginas 272-275, da a conocer el proceso de clonación, secuenciación y expression del gen de Pu-NPasa I de la cepa TH 6-2 de *Bacillus stearothermophilus*. El gen clonado se overexpresó en *E. coli* mediante la utilización del promotor *trc* para producir una enzima activa en grandes cantidades.
- 25 Cacciapuoti Giovanna et al. "Purine nucleoside phosphorylases from hyperthermophilic Archaea require a CXC motif for stability and folding", *The Febs Journal* Oct 2009 LNKDS-PUBMED: 19740110, vol. 276, no. 20, Octubre 2009, páginas 5799-5805, da a conocer el estudio de cómo el motive CXC mejora la estabilidad y el plegado en proteínas hipertermófilas con enlaces disulfuro, en particular en la 5'-desoxi-5'-metiladenosina fosforilasa II hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* (SsMTAPII).
- 30 Cacciapuoti Giovanna et al. "A novel hyperthermostable 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*", *Febs Journal*, vol. 272, no. 8, Abril 2005, páginas 1886-1899, da a conocer la 5'-desoxi-5'-metiltioladenosin fosforilasa hipertermoestable de la arquea *Sulfolobus solfataricus*, que se clonó y expresó en *E. coli*.
- 35 Cacciapuoti Giovanna et al. "Biochemical and structural characterization of mammalian-like purine nucleoside phosphorylase from the Archaeon *Pyrococcus furiosus*", *Febs Journal*, vol. 274, no. 10, Mayo 2007, páginas 2482-2495, da a conocer la caracterización de la primera purina nucleósido fosforilasa de tipo mamífero de la arquea hipertermófila *Pyrococcus furiosus* (PfPNP). El gen PF0853 que codifica PfPNP se clonó y expresó en *E. coli* y la proteína recombinante se purificó hasta homogeneidad.
- 40 She Quinxin et al. "The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 14, 3 Julio 2001, páginas 7835-7840, da a conocer la secuencia de la proteína DeoD de *Sulfolobus solfataricus*, cuya secuencia de codificación (nucleótidos 1372685-1371861 del genoma de *Sulfolobus solfataricus*) corresponde a la SEQ ID NO: 7 de la presente invención.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a un vector de expresión recombinante tal como se define en las reivindicaciones.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento de transglicosilación tal como se define en las reivindicaciones.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra un ejemplo de dos reacciones enzimáticas catalizadas por nucleósido fosforilasas. La primera reacción, en la parte superior, es una fosforólisis que tiene lugar a través de un mecanismo de tipo S_N1 , mediante un intermedio de tipo oxonio para dar α -ribosa-1-fosfato. La segunda reacción ocurre a través de un mecanismo S_N2 donde el fosfato es sustituido por una base proporcionando el β -nucleósido [13]. En el esquema, la uridina nucleósido fosforilasa cataliza la escisión fosforolítica del enlace glicosídico C-N de uridina que da lugar a ribosa-1-fosfato y uracilo. La purina nucleósido fosforilasa (adenosina nucleósido fosforilasa) cataliza la escisión del enlace glicosídico, en presencia de ortofosfato inorgánico (P_i) como segundo sustrato, para generar la base púrica y la ribosa(desoxirribosa)-1-fosfato. Para los sustratos naturales las reacciones son irreversibles.

Figura 2. Esquema de la síntesis en una sola etapa sintética ("*one-pot*") usando enzimas nucleósido fosforilasas.

La figura 3 muestra el mapa genético del vector de expresión inicial pET102/D-TOPO® antes del clonaje. Longitud del vector 6315 nucleótidos. Promotor T7: bases 209-225; región para los cebadores del promotor T7: bases 209-228; operador lac (lacO): bases 228-252; región de unión al ribosoma (RBS): bases 282-288; marco abierto de lectura (ORF) de la tioredoxina con parche de histidinas (HP): bases 298-627; región para los cebadores directos TrxFus: bases 607-624; región de reconocimiento de la enteroquinasa (EK): bases 643-657; región 1 de reconocimiento de TOPO®: bases 670-674; secuencia ("overhang"): bases 675-678; región 2 de reconocimiento de TOPO®: bases 679-683; epítipo V5: bases 700-741; región de polihistidina (6xHis): bases 751-768; región para los cebadores inversos de T7: bases 822-841; región de terminación de la transcripción de T7: bases 783-911; promotor bla: bases 1407-1505; ORF del gen de resistencia a la ampicilina (bla): bases 1506-2366 origen de pBR322: bases 2511-3184; ORF de ROP: bases 3552-3743 (hebra complementaria); ORF de lacI: bases 5055-6146 (hebra complementaria).

La figura 4 muestra una "matriz Doehlert", en la que cinco temperaturas se combinaron con tres valores de pH lo que resulta en siete combinaciones de temperatura y pH.

Figura 5. Gráfico de contorno que muestra el efecto interactivo del pH y la temperatura sobre la actividad de UPasa. Los datos fueron analizados estadísticamente con la metodología de superficie de respuesta (RSM), utilizando el programa "Minitab". La enzima parece muy termófila y su actividad se ve incrementada significativamente hasta la temperatura más alta ensayada (100°C) y se mostró actividad a un pH distinto óptimo cercano a la neutralidad (6,5-7,5), preferiblemente 7,0.

Figura 6. Gráfico de contorno que muestra el efecto interactivo del pH y la temperatura sobre la actividad de PNPasa. Los datos fueron analizados estadísticamente con la metodología de superficie de respuesta (RSM), utilizando el programa "Minitab". La enzima parece muy termófila y su actividad se ve incrementada significativamente hasta la temperatura más alta ensayada (100°C) y se mostró actividad a un pH distinto óptimo cercano a la neutralidad (6,5-7,0).

La figura 7 muestra la secuencia de ADN (SEQ ID NO. 7) de la región codificante para la purina nucleósido fosforilasa (PNPasa) de *Sulfolobus solfataricus*, también conocido como gen *deoD*. Número de acceso en GenBank AE006766.

La figura 8 muestra la secuencia de ADN (SEQ ID NO. 8) de la región codificante para la pirimidina nucleósido fosforilasa (UPasa) de *Aeropyrum permix*, también conocido como gen *udp*. Número de acceso en GenBank NC000854.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un vector de expresión recombinante tal como se define en las reivindicaciones, siendo el resto de las realizaciones relacionadas con el mismo no parte de la invención, pero que representan la técnica de base útil para entender la invención.

Aeropyrum permix y *Sulfolobus solfataricus* son arqueas hipertermófilas capaces de crecer a altas temperaturas, por encima de los 90°C. Las arqueas son organismos que pertenecen a un tercer grupo de organismos bien diferenciado de los eucariotas y de los procariontes. Se consideran descendientes de organismos primitivos y son organismos especiales que no han evolucionado ni se han adaptado a las condiciones de temperatura ordinarias.

Las enzimas UPasa y PNPasa en sus condiciones naturales intracelulares no permiten la síntesis de nucleósidos o análogos de nucleósidos con un alto rendimiento, tal como se desea a nivel industrial. Para superar esta importante limitación, los inventores han usado la tecnología del ADN recombinante para diseñar un vector de expresión que comprende los genes *udp* y *deoD* y los elementos apropiados para sobreexpresar las nucleósido fosforilasas en las células hospedadoras adecuadas, tal como bacterias. El vector de expresión diseñado también facilita la solubilización y la purificación de las diferentes fosforilasas.

Los vectores de la presente invención comprenden la secuencia nucleotídica codificante de diferentes nucleósido fosforilasas y las secuencias de nucleótidos que permiten a dicho vector ser seleccionable y que se replique autónomamente dentro de la célula hospedadora.

La construcción del vector de expresión recombinante se lleva a cabo usando tecnologías convencionales de ADN recombinante, es decir, procedimientos para unir segmentos de ADN juntos en un sistema libre de células.

El término "vector" se refiere a una molécula de ADN originada a partir de un virus, un plásmido o una célula de un organismo superior en el que otro fragmento de ADN con un tamaño apropiado puede ser integrado (clonado) sin que el vector pierda la capacidad de replicarse autónomamente. Ejemplos de vectores son plásmidos, cósmidos, y cromosomas artificiales de levaduras. Los vectores generalmente son moléculas recombinantes con secuencias de

ADN de orígenes diversos. El término "vector de expresión" se refiere a un vector que además comprende las secuencias regulatorias y controladoras necesarias para permitir la transcripción y la traducción del gen o los genes clonados. Los vectores de ADN lineales o circularizados son útiles para la presente invención.

5 Para que el vector en la presente invención sea seleccionable y replicable autónomamente en células hospedadoras, el vector seleccionado tiene que ser compatible con las células hospedadoras seleccionadas. La secuencia de nucleótidos que permite al vector ser seleccionable y capaz de replicarse autónomamente en *Escherichia coli*, es el gen que codifica el promotor T7, que permite a la ARN polimerasa T7 de la cepa seleccionada de *Escherichia coli* unirse al promotor. El término "seleccionable" significa que el vector permanece estable en las bacterias descendientes. La selección se consigue mediante condiciones del medio estrictas de acuerdo con la introducción en el vector de un gen marcador de selección apropiado, cuya expresión permite identificar las células que han sido transformadas con el vector. El gen marcador de selección es a menudo un gen de resistencia a un antibiótico. Algunos genes marcadores de selección preferidos en esta invención son kanamicina, tetraciclina, carbenicilina, y más preferiblemente, ampicilina.

15 La presente invención se refiere además a la células hospedadora de *E. coli* tal como se define en las reivindicaciones.

20 El término "célula hospedadora" se refiere a una célula transformada con un vector de expresión recombinante que comprende la secuencias nucleotídicas de PNPasa y UPasa. Otro aspecto del vector de ADN recombinante permite que la célula hospedadora produzca nucleósido fosforilasas y cuando las condiciones del medio son adecuadas, dichas nucleósido fosforilasas catalizan la obtención de nucleósidos. Los genes de PNPasa y UPasa de *Sulfolobus solfataricus* y *Aeropyrum pernix*, respectivamente, son introducidos en el vector de expresión de ADN. Las figuras 7 y 8 muestran las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos relevantes para la invención, en particular la secuencia de ácidos nucleicos de *Sulfolobus solfataricus deoD* (SEQ ID No. 7) y la secuencia de ácidos nucleicos de *Aeropyrum pernix udp* (SEQ ID No. 8), respectivamente.

25 El experto en la materia elegirá de manera adecuada el sistema de expresión constituido por el vector inicial y una cepa de la célula hospedadora para maximizar la producción de nucleósidos.

30 La *Escherichia coli* pertenece a la cepa bacteriana BL21. Los vectores de expresión adecuados para *Escherichia coli* B21 son, por ejemplo, vectores pET, trcHis y pUB (todos ellos de la casa comercial Invitrogen) y vectores pGEX y GST (de la casa comercial Amersham). También son útiles en esta invención la cepa bacteriana *Escherichia coli* DH5 alfa, en combinación con los vectores pUC y *Escherichia coli* F' en combinación con los vectores PSL, vectores PEZZ o vectores M13 (todos ellos de Amersham).

35 En una realización, un lisado se obtiene lisando la célula hospedadora tal como se define en las reivindicaciones.

40 La presente invención también se refiere a un procedimiento de transglicosilación tal como se define en las reivindicaciones, siendo el resto de las realizaciones relacionadas con el mismo no parte de la invención, pero que representan la técnica de base útil para entender la invención.

45 El término "nucleósido donador de azúcar" se refiere a una glicosilamina que consiste en una nucleobase (a menudo denominado simplemente como base) unida a un azúcar de ribosa o desoxirribosa mediante un enlace beta-glicosídico. Ejemplos de "nucleósido donador de azúcar" incluyen, sin limitarse a, citidina, uridina, adenosina, guanosa, timidina e inosina, así como los nucleósidos naturales o modificados que contienen D-ribosa o 2'-desoxirribosa; nucleósidos que contienen el grupo ribosa modificado en las posiciones 2', 3' y/o 5'; y nucleósidos en los que el azúcar es beta-D-arabinosa, alfa-L-xilosa, 3'-desoxirribosa, 3',5'-didesoxirribosa, 2',3'-didesoxirribosa, 5'-desoxirribosa, 2',5'-didesoxirribosa, 2'-amino-2'-desoxirribosa, 3'-amino-3'-desoxirribosa, o 2'-fluoro-2'-desoxirribosa.

50 El término "base aceptora" se refiere a una nucleobase, base de nucleótidos, base nitrogenada, o simplemente base. En la naturaleza, las bases son parte de ADN o ARN. Las nucleobases primarias son citosina, guanina, adenina (ADN y ARN), timina (ADN) y uracilo (ARN), abreviados como C, G, A, T, y U, respectivamente. El término "base aceptora" en la presente invención pretende comprender también nucleobases modificadas y análogas. En el ADN, la base modificada más común es 5-metilcitidina (m5C). En el ARN, hay muchas bases modificadas, incluyendo pseudouridina (Ψ), dihidouridina (D), inosina (I), ribotimidina (rT) y 7-metilguanosa (m7G). Hipoxantina y xantina son dos de las muchas bases creadas a través de la presencia de un mutágeno. Otros ejemplos de basesceptoras incluyen bases de pirimidina y purina naturales o sustituidas; bases de purina sustituidas en una o más de las posiciones 1, 2, 6; bases de pirimidina sustituidas en una o más de las posiciones 3, 5; y purina, 2-azapurina, 8-azapurina, 1-deazapurina (imidazopiridina), 3-deazapurina, 7-deazapurina, 2,6-diaminopurina, 5-fluorouracilo, 5-trifluorometiluracilo, *trans*-zeatina, 2-cloro-6-metilaminopurina, 6-dimetilaminopurina, 6-mercaptapurina.

65 Este procedimiento de transglicosilación es útil para la preparación de nucleósidos, análogos de nucleósidos, y particularmente principios farmacéuticos activos (API); que comprenden, contienen o consisten en grupos de nucleósidos, o análogos de los mismos. Entendiendo un API como cualquier sustancia o mezcla de sustancias

destinadas a utilizarse en la fabricación de un producto farmacológico (medicinal) y que, cuando se utiliza en la producción de un fármaco, se convierte en un principio activo del producto farmacológico. Dichas sustancias pretenden proporcionar actividad farmacológica u otro efecto en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad o afectan en la estructura y función del cuerpo. (Eudralex, Part II del volumen 4 EU Guidelines to Good Manufacturing Practice).

La combinación de uridina fosforilasa (UPasa, E.C. 2.4.2.3) y purina nucleósido fosforilasa (PNP; E.C. 2.4.2.1) transfiere de manera eficiente un grupo azúcar desde un nucleósido donador a una base aceptora.

Cuando los nucleósidos de pirimidina se preparan partiendo de otros nucleósidos de pirimidina y bases pirimidínicas como materiales de partida, entonces la utilización de la UPasa sola es suficiente, pero la utilización de ambas enzimas, PNPasa y UPasa es preferente porque la PNPasa también puede contribuir a la etapa de fosforólisis. En cambio, cuando se preparan nucleósidos de purina partiendo de otros nucleósidos de purina y bases purínicas como materiales de partida, entonces la utilización de tanto PNPasa como UPasa también es preferida. Por otro lado, la utilización de ambas enzimas PNPasa y UPasa es mucho más satisfactoria cuando la reacción es de un nucleósido de pirimidina a un nucleósido de purina, por ejemplo, de una uridina a una 2,6-diaminopurina ribósido, cuando se compara con la utilización de cada tipo de enzima por separado.

El procedimiento de transglicosilación utiliza una combinación de UPasa y PNPasa. Los lisados celulares crudos o las soluciones clarificadas de enzimas crudas se pueden mezclar en diferentes proporciones para obtener un biocatalizador optimizado para una reacción de transglicosilación particular.

En el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, la UPasa de *Aeropyrum pernix* y la PNPasa de *Sulfolobus solfataricus* son proporcionadas por una célula hospedadora tal como se define en las reivindicaciones.

En una realización, en el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, la combinación de UPasa y PNPasa se utiliza en forma de lisado.

En una realización, el procedimiento de transglicosilación comprende las etapas de: (I) cultivo de la célula hospedadora en un medio de cultivo adecuado; (II) sobreexpresión de UPasa, PNPasa, o de ambas enzimas; (III) opcionalmente preparación de un lisado celular; (IV) adición de un nucleósido donador de azúcar, una base aceptora, e iones fosfato, y (V) recuperación de los nucleósidos a partir de la mezcla de reacción.

En una realización particular, el transformante de *Escherichia coli* que comprende el vector se puede hacer crecer en un medio de cultivo que comprende triptona, extracto de levadura, cloruro de sodio y un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en kanamicina, tetraciclina, carbenicilina, y ampicilina, preferiblemente, a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica, medida a una longitud de onda de aproximadamente 600 nm, de entre 0,5-0,8. A continuación, se puede añadir al cultivo isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) para alcanzar una concentración final de 100 mg/l y se pueden realizar inducciones a 37°C durante 6-12 horas. Las células pueden ser recuperadas mediante centrifugación a 4°C y los residuos celulares se pueden lisar usando tres ciclos de congelación-descongelación. Las células hospedadoras recombinantes se pueden alterar mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. El lisado celular resultante puede ser usado directamente como biocatalizador o centrifugarse para eliminar el debris celular y obtener soluciones enzimáticas crudas clarificadas. El término "biocatalizador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier entidad biológica capaz de catalizar la conversión de un sustrato en un producto, en este caso la biotransformación de nucleósidos.

En una realización, en el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, el nucleósido donador de azúcar se selecciona entre nucleósidos naturales o modificados que contienen D-ribosa y 2'-desoxirribosa; nucleósidos que contienen el grupo ribosa modificado en las posiciones 2', 3' y/o 5'; y nucleósidos en los cuales el azúcar es beta-D-arabinosa, alfa-L-xilosa, 3'-desoxirribosa, 3',5'-didesoxirribosa, 2',3'-didesoxirribosa, 5'-desoxirribosa, 2',5'-didesoxirribosa, 2'-amino-2'-desoxirribosa, 3'-amino-3'-desoxirribosa, 2'-fluoro-2'-desoxirribosa.

En una realización, en el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, la base aceptora se selecciona entre las bases purínicas y pirimidínicas naturales o sustituidas; bases purínicas sustituidas en las posiciones 1, 2, 6, o una combinación de las mismas, del anillo purínico; bases pirimidínicas sustituidas en las posiciones 3, 5, o una combinación de las mismas, del anillo pirimidínico; por ejemplo, purina, 2-azapurina, 8-azapurina, 1-deazapurina (imidazopiridina), 3-deazapurina, 7-deazapurina, 2,6-diaminopurina, 5-fluorouracilo, 5-trifluorometiluracilo, trans-zeatina, 2-cloro-6-metilaminopurina, 6-dimetilaminopurina, 6-mercaptapurina.

En una realización, en el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, el análogo de nucleósido resultante es un principio farmacéutico activo (API) tal como se conoce en la técnica.

En una realización, en el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, dicho procedimiento se lleva a cabo entre 60 y 100°C.

En una realización, el procedimiento de transglicosilación de la presente invención se lleva a cabo en medios acuosos o en un sistema de codisolventes polares apróticos.

5 En una realización, el sistema de codisolventes polares apróticos se selecciona entre dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, dimetilformamida, o cualquier combinación de los mismos.

En una realización, en el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, el nucleósido donador de azúcar se selecciona entre uridina y 2'-desoxiuridina, y la base aceptora es la 2,6-diaminopurina.

10 En una realización, se proporciona una síntesis enzimática de nucleósidos "one-pot" utilizando uridina o 2'-desoxiuridina como dadores de grupos de azúcar, ya que la enzima UPasa recombinante de la presente invención es la más específica para estos sustratos. Sin embargo, esta enzima se puede utilizar con cualquier donador de grupos de azúcar porque no discrimina entre uridina, 2'-desoxiuridina, y otros nucleósidos de pirimidina, como desafortunadamente ocurre en muchos organismos inferiores, tales como *B. stearothermophilus* [14].

En una realización, en el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, el nucleósido donador de azúcar se selecciona entre uridina y 2'-desoxiuridina, y la base aceptora es 5-fluorouracilo.

20 En una realización, en el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, el nucleósido donador de azúcar se selecciona entre uridina y 2'-desoxiuridina, y la base aceptora es 5-trifluorometiluracilo.

En una realización, en el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, el nucleósido donador de azúcar se selecciona entre uridina y 2'-desoxiuridina, y la base aceptora es trans-zeatina.

25 En una realización, en el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, el nucleósido donador de azúcar se selecciona entre uridina y 2'-desoxiuridina, y la base aceptora es 2-cloro-6-metilaminopurina.

30 En una realización, en el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, el nucleósido donador de azúcar se selecciona entre uridina y 2'-desoxiuridina, y la base aceptora es 6-dimetilaminopurina.

En una realización, en el procedimiento de transglicosilación de la presente invención, el nucleósido donador de azúcar se selecciona entre uridina y 2'-desoxiuridina, y la base aceptora es 6-mercaptopurina.

35 El término "nucleósido fosforilasa termoestable", se refiere a enzimas que son estables al calor, resistentes al calor y que retienen suficiente actividad nucleósido fosforilasa como para llevar a cabo otras reacciones sin desnaturalizarse irreversiblemente (inactivarse) cuando se someten a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para realizar las reacciones de transglicosilación.

40 Los ejemplos siguientes tienen el propósito de ilustrar la presente invención sin constituir una limitación del campo de aplicación de la misma.

Ejemplos

45 Como se ha indicado anteriormente, las reacciones de transglicosilación según la presente invención se llevaron a cabo utilizando las enzimas UPasa y PNPasa obtenidas a partir de células productoras de estas enzimas. Tales células son preferiblemente células de *Escherichia coli* modificada genéticamente capaces de expresar cantidades considerables de UPasa o PNPasa. Cómo se obtienen dichas células, las enzimas y sus características, así como la producción de algunos análogos de nucleósidos se muestran en los ejemplos que se acompañan expuestos a continuación.

50

Ejemplo 1

Construcción de la *deoD* de *Escherichia coli*

55 La secuencia de la Purina Nucleósido Fosforilasa (PNPasa) de *Sulfolobus solfataricus* fue encontrada en la base de datos GenBank, con el número de acceso AE006766. El gen fue amplificado por PCR utilizando 2 unidades de la enzima Platinum Pfx (Invitrogen), 1 mM de Mg₂SO₄ y 1x tampón de amplificación de enzima, 200 μM de dNTPs y 0,3 μM de cada cebador ("primer") con los oligonucleótidos 5'-caccgtgccatttttagaaaatggtcc-3' (*Sulfolobus solfataricus deoD* directo; SEQ ID NO. 1) y 5'-aatcagtttaagaatctaaggaat-3' (*Sulfolobus solfataricus deoD* inverso; SEQ ID NO. 2) de *Sulfolobus solfataricus* P2 [15]. La reacción de PCR fue llevada a cabo con un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 30 min, seguido de 36 ciclos de temperatura de un paso de desnaturalización a 94°C durante 1 min y un paso de hibridación/extensión a 60°C durante 1,5 min y a 68°C durante 10 min. Después de los 36 ciclos, la muestra se sometió a 68°C durante 10 minutos y finalmente a 4°C. El producto PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa y la banda de ADN fue purificada del gel (S.N.A.P™ UV-Free Gel Purification

65

Kit, Invitrogen). El fragmento amplificado fue clonado en la región polienlazadora del vector pUC18 que lleva el gen de resistencia a la ampicilina [17]. La región clonada fue secuenciada completamente y se halló que era completamente idéntica a las secuencias de la base de datos.

5 Ejemplo 2

Construcción de la *udp* de *Escherichia coli*

La secuencia de la Pirimidina Nucleósido Fosforilasa (UPasa) de *Aeropyrum pernix* fue encontrada en la base de datos GenBank, con el número de acceso NC_000854.2. El gen fue amplificado por PCR utilizando 2 unidades de la enzima Platinum Pfx (Invitrogen), 1 mM de Mg₂SO₄ y 1x tampón de amplificación de enzima, 200 μM de dNTPs y 0,3 μM de cada cebador ("primer") con los oligonucleótidos 5'-caccgtggcccgctcgttctctc-3' (*Aeropyrum pernix* udp directo; SEQ ID NO. 3) y 5'-gaattcctatgtgctgtcgcacgccagg-3' (*Aeropyrum pernix* inverso; SEQ ID NO. 4) de *Aeropyrum pernix* K1 [16]. La reacción de PCR fue llevada a cabo con un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 30 min, seguido de 36 ciclos de temperatura de un paso de desnaturalización a 94°C durante 1 min y un paso de hibridación/extensión a 60°C durante 1,5 min y 68°C durante 10 min. Después de los 36 ciclos, la muestra se sometió a 68°C durante 10 minutos y por último, a 4°C. El producto PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa y la banda de ADN fue purificada del gel (S.N.A.P.TM UV-Free Gel Purification Kit, Invitrogen). El fragmento amplificado se clonó en la región polienlazadora del vector pUC18 que lleva el gen de resistencia a la ampicilina [17]. La región clonada fue secuenciada completamente y se halló que era completamente idéntica a las secuencias de la base de datos.

Ejemplo 3

Clonación en el vector pET102/D-TOPO® y transformación de las células

Los fragmentos de ADN que contienen las secuencias de los genes *deoD* de *Sulfolobus sulfataricus* y los genes *udp* de *Aeropyrum pernix* fueron clonados en el vector pET102/D-TOPO® (pET102 Directional TOPO® Expression Kit, Invitrogen) que comprende el origen de replicación del plásmido pBR322, un gen de resistencia a ampicilina, un promotor T7 que permite la unión de la ARN polimerasa T7, un operador *lac* que permite la inhibición de la expresión cuando el isopropiltiogalactopiranosido (IPTG) no está presente, un sitio de unión al ribosoma para la traducción de ARN, un parche de His-tioredoxina para incrementar la solubilidad de las proteínas de fusión y una etiqueta de polihistidina (6xHis) para la detección y purificación de las proteínas de fusión (figura 3). El vector fue introducido por choque térmico en *Escherichia coli* BL21 (pET102 Directional TOPO® Expression Kit, Invitrogen), una cepa comercial para la expresión regulada de genes heterólogos. Comprende el gen que codifica la ARN polimerasa T7 que hace que la cepa sea compatible con la utilización de vectores pET que comprenden el promotor T7 para la sobreexpresión de proteínas recombinantes con IPTG.

Los vectores recombinantes resultantes fueron analizados por restricción de ADN con 10 unidades de la enzima HindIII. El clon positivo fue secuenciado utilizando los cebadores de secuenciación TrxFus directo 5' 'TTCCTCGACGCTAACCTG, 3' (SEQ ID No. 5) y T7 inverso 5' TAGTTATTGCTCAGGGGTGG 3' (SEQ ID No. 6).

Ejemplo 4

Fermentación de las cepas recombinantes

Las cepas recombinantes a las que se refiere la presente invención fueron cultivadas, por separado, en discontinuo, a pH 7, en medio sólido de a base de tripticasa de soja suplementado con ampicilina. Se pasó una colonia del cultivo en un caldo de nutrientes n° 2 (Oxoid) que contenía polvo Lab-lemco 10 g/l, peptona 10 g/l y NaCl 5 g/l, suplementado con 200 mg/l ampicilina. Se incubó a 37°C, en condiciones de agitación vigorosa (200 rpm). Las cepas de *Escherichia coli* que albergaban el plásmido de expresión se desarrollaron hasta una densidad óptica de 0,6 a 600 nm, entonces se añadió IPTG (hasta 100 mg/l) y se dejó el cultivo en las mismas condiciones de incubación otras 8 horas. Cuando se ha completado la fermentación, el medio de cultivo fue centrifugado y el sedimento celular se lavó con solución tampón fosfato 30 mM-pH 7. La biomasa obtenida fue conservada a -20°C hasta el momento de su uso.

Ejemplo 5

Purificación parcial de UPasa y PNPasa (preparación de lisado celular)

Para una purificación parcial de la proteína, la pasta celular, separada mediante centrifugación o mediante microfiltración de un cultivo de la cepa recombinante que expresa la enzima UPasa o PNPasa, se alteró mediante la adición de 160 mg de lisozima y una hora de incubación a 0°C, seguido de tres ciclos de congelación-descongelación ultrarrápidos (-80 °C/37°C) y un paso final para reducir la viscosidad consistente en la adición de 1.000 unidades de desoxirribonucleasa I.

Ejemplo 6Determinación de la actividad enzimática de la enzima UPasa

5 Se añadieron 100 microlitros del lisado celular centrifugado, que comprende una suspensión de células que expresan UPasa, diluido 1:100 (volumen/volumen) con tampón fosfato de potasio a pH 7, se añadieron a 800 microlitros de una solución de uridina 75 mM en tampón fosfato 100 mM a pH 7,0, se preincubaron a 30°C. Después de 5 minutos, la reacción de fosforólisis se detuvo mediante la adición de 1 ml de HCl 2N. Se analizó una alícuota de la mezcla de reacción mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) equipada con una columna Kromasil 100-5C18 (Akzo Nobel) de 250 x 4,6 mm. La elución se llevó a cabo usando una solución de 4% metanol-agua. La actividad enzimática del lisado celular se expresó en unidades por ml ($\mu\text{moles of uracilo} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$) y se calculó en relación a soluciones patrón de uracilo eluidas en las mismas condiciones. Se recuperaron aproximadamente 590 unidades por ml de lisado celular centrifugado.

Ejemplo 7Determinación de la actividad enzimática de la enzima PNPasa

20 Se añadieron 100 microlitros del lisado celular centrifugado, que comprende una suspensión de células que expresan PNPasa, diluido 1:100 (volumen/volumen) con tampón fosfato de potasio a pH 7, se añadieron a 800 microlitros de una solución de inosina 60 mM en tampón fosfato 100 mM a pH 7,0, se preincubaron a 30°C. Exactamente 10 minutos después, la reacción de fosforólisis se detuvo mediante la adición de 1 ml de HCl 2N. Se analizó una alícuota de la mezcla de reacción mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) equipada con una columna Kromasil 100-5C18 (Akzo Nobel) de 250 x 4,6 mm. La elución se llevó a cabo usando una solución de 4% metanol-agua. La actividad enzimática del lisado celular se expresó en unidades por ml ($\mu\text{moles of hipoxantina} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$) y se calculó en relación a soluciones patrón de hipoxantina eluidas en las mismas condiciones. Se recuperaron aproximadamente 310 unidades por ml de lisado celular centrifugado.

Ejemplo 8Determinación de la actividad catalítica de transglicosilación

35 Para la determinación de la actividad catalítica de transglicosilación se preparó la mezcla de lisados celulares que contenían UPasa y PNPasa mezclando los lisados para tener una proporción de actividad enzimática UPasa:PNPasa de aproximadamente 1:1, determinada en los ejemplos 6 y 7. La reacción de transglicosilación se llevó a cabo a escala analítica en las siguientes condiciones: se añadieron 250 μl de lisados celulares (equivalentes a 14 unidades de las actividades enzimática de cada una de UPasa y PNPasa) a 10 ml de una solución que tenía la siguiente composición: 4 mM de 1- β -D-ribofuranosiluracilo (nucleósido de uridina), 4 mM de base adenina, tampón fosfato de potasio 30 mM pH 7, controlada termostáticamente a 60°C. Después de 1,5 horas a 60°C, la reacción se detuvo diluyendo la mezcla 1:5 y enfriando en un baño de hielo. El porcentaje de bioconversión de la base adenina a 9- β -D-ribofuranosiladenina (nucleósido de adenosina) se determinó analizando una alícuota de la mezcla de reacción mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando una columna Kromasil 100-5C18 (Akzo Nobel) de un tamaño de 250 x 4,6 mm y elución con una solución 4% de metanol-agua. La actividad catalítica de transglicosilación se expresó en unidades $\cdot \text{ml}^{-1}$ ($\mu\text{moles de Ara-A formados en 1,5 horas} \cdot \text{ml}^{-1}$ de una mezcla de lisados celulares) o en unidades $\cdot \text{g}^{-1}$ de resina húmeda ($\mu\text{moles de D-ribofuranosiladenina formados en 1,5 horas} \cdot \text{ml}^{-1}$ de lisados celulares) y se calculó en relación a una solución patrón de D-ribofuranosiladenina eluida mediante HPLC en las mismas condiciones. Bajo estas condiciones, se formó aproximadamente un 55% de nucleósido de adenosina (aproximadamente 9 unidades por ml de lisado celular).

Ejemplo 9Efecto de la temperatura y el pH sobre las actividades de las nucleósido fosforilasas

55 La influencia del pH y la temperatura sobre la acción de las nucleósido fosforilasas fue investigada mediante "diseños de procedimientos de experimentos". Se combinaron diferentes temperaturas con diferentes valores de pH para encontrar las condiciones que resulten en la maximización de las actividades enzimáticas. Se definió un dominio experimental entre 80°C-100°C y pH 5,5-8,5. Como se muestra en la figura 4, se combinaron cinco temperaturas con tres valores de pH de acuerdo con la "Matriz Doehlert", dando lugar a 7 combinaciones de temperatura y pH. Los sustratos fueron incubados en las soluciones de reacción seleccionadas y temperatura sin enzima y a continuación se añadió la enzima y se incubó en las condiciones seleccionadas. Las muestras se procesaron como se ha descrito anteriormente para la determinación de la actividad enzimática de las enzimas PNPasa o UPasa. Los valores de actividad se expresaron como un porcentaje de los valores máximos encontrados (100%). En las figuras 5 y 6, respectivamente, se muestran los resultados.

65

Ejemplo 10Termoestabilidad

5 La termoestabilidad de las enzimas fue estudiada a 80°C. Se prepararon alícuotas de la enzima entre 100 y 200 microlitros de una suspensión de células (lisado celular) que expresaban UPasa o/y PNPasa, diluidas 1:100 o 1:1000 (volumen/volumen) usando tampón fosfato, pH 7,0-7,2. Los biocatalizadores se incubaron a 80°C durante tiempos diferentes. Después de calentar, las soluciones se colocaron inmediatamente en hielo y se realizó la medición de las actividades de nucleósido fosforilasas tal como se describe en los ejemplos 6 y 7. No se observó pérdida de las actividades de las nucleósido fosforilasas después de 10 horas a 80°C.

Efectos de los disolventes sobre la actividad de las nucleósido fosforilasas.

15 Los codisolventes orgánicos son con frecuencia utilizados en reacciones y las enzimas aisladas deben ser capaces de sobrevivir en condiciones de concentraciones relativamente elevadas de codisolventes. Los experimentos fueron llevados a cabo con la presencia de disolventes orgánicos, tal como el metanol (disolvente polar prótico) y dimetilsulfóxido (disolvente polar aprótico). Las nucleósido fosforilasas de la presente invención fueron resistentes a los disolventes orgánicos mostrando actividad en una solución tampón que contenía 5 y 10% en volumen de disolvente orgánico.

Tabla 1. Estabilidad de la enzima PNPasa frente algunos disolventes orgánicos

Disolventes orgánicos	Actividad relativa (%) ^a	
	DMSO	MeOH
5% (v/v)	94	95
10% (v/v)	115	86

25 ^aLa actividad relativa del lisado celular que comprende la enzima PNPasa se determinó usando el ensayo estándar descrito en el ejemplo 7 a dos concentraciones de los disolventes orgánicos y su actividad relativa se comparó con la actividad de los lisados celulares que comprenden la enzima PNPasa sin disolventes orgánicos. DMSO: dimetilsulfóxido; MeOH: metanol.

Tabla 2. Estabilidad de la enzima UPasa frente algunos disolventes orgánicos

Disolventes orgánicos	Actividad relativa (%) ^b	
	DMSO	MeOH
5% (v/v)	91	151
10% (v/v)	70	206

30 ^bLa actividad relativa del lisado celular que comprende la enzima UPasa se determinó usando el ensayo estándar descrito en el ejemplo 6 a dos concentraciones de los disolventes orgánicos y su actividad relativa se comparó con la actividad de los lisados que comprenden la enzima UPasa sin disolventes orgánicos. DMSO: dimetilsulfóxido; MeOH: metanol

Ejemplo 11Procedimientos generales de bioconversión

40 Las reacciones de transglicosilación en una sola etapa ("one-pot") fueron realizadas a las temperaturas y pH de reacción seleccionados, en recipientes de reacción con agitación moderada. La actividad catalítica de transglicosilación de la mezcla de lisados celulares utilizados fue de aproximadamente 12 unidades por ml (determinadas como se describe en el ejemplo 8). Los nucleósidos fueron preparados usando una mezcla del lisado celular preparado para obtener una proporción de actividad PNPasa:UPasa de 1:1.

45 Los sustratos fueron:

- 1) 2'-desoxirribonucleósidos o ribonucleósidos naturales que actúan como donadores de 2'-desoxirribosa-1-fosfato o ribosa-1-fosfato;
- 2) Una base púrica o pirimidínica natural o sintética secundaria, que está unida a la posición 1 del azúcar.

50

Al final de las reacciones, la mezcla de reacción se centrifugó y a continuación se filtró usando un dispositivo Amicon Ultrafiltration (membrana YM-3) y los productos se separaron de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Los biocatalizadores pueden ser reciclados en reacciones consecutivas (normalmente entre 3-5 reacciones) mediante la adición de mezclas de reacción frescas. Las soluciones filtradas se monitorizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente. Los rendimientos de bioconversión fueron calculados en base a la concentración inicial del análogo de la base.

Ejemplo 12

10 Preparación de nucleósidos de 2,6-diaminopurina

La preparación de nucleósidos púricos es más difícil debido a la baja solubilidad de estas bases en medios acuosos. En la presente invención, los inventores usaron las propiedades competitivas de las enzimas para resolver este problema. La estrategia usada por los inventores comprendía el uso de codisolventes orgánicos y/o altas temperaturas para incrementar la solubilidad de los sustratos.

15 12.1 Preparación de nucleósidos de 2,6-diaminopurina usando codisolventes.

Los ensayos se realizaron usando concentraciones de 5 y 10% de codisolventes dipolares apróticos a 60°C; se añadieron 12 unidades/ml de lisado celular a 150 ml de una solución mantenida termostáticamente a 60°C y que tenía la siguiente composición de soluciones sustrato:

1. 15 mM de uridina/2'-desoxiuridina,
2. 5 mM de 2,6-diaminopurina, y
- 25 3. 30 mM de tampón fosfato de potasio, pH 7.

Después de 5 horas, la mezcla de reacción se filtró por centrifugación a 2000 ×g durante 30 min, a 4°C, usando un Amicon ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, MA) con un tamaño de corte de 3000 Da y se recuperó el filtrado. En la tabla 3, se muestran los rendimientos de producción de nucleósidos de 2,6-diaminopurina preparados en presencia de codisolventes. Los nucleósidos de 2,6-diaminopurina (2,6-diaminopurina ribósido o 2,6-diaminopurina desoxiribósido) resultantes se analizaron mediante HPLC. En estas reacciones, los productos se obtuvieron en rendimientos elevados (sobre el 80%).

35 Tabla 3. Rendimientos de la producción de nucleósidos de 2,6-diaminopurina utilizando codisolventes a diferentes concentraciones (%) a 60°C. THF: Tetrahidrofurano; DMSO:dimetilsulfóxido

Codisolvente	Sustrato	Base análoga	Producto	Rendimiento(%)
10% DMSO	Uridina	2,6-Diaminopurina	2,6-Diaminopurina ribósido	97
10% DMSO	2'-Desoxiuridina	2,6-Diaminopurina	2,6-Diaminopurina desoxiribósido	96
5% THF	Uridina	2,6-Diaminopurina	2,6-Diaminopurina ribósido	84
5% THF	2'-Desoxiuridina	2,6-Diaminopurina	2,6-Diaminopurina desoxiribósido	90

40 12.2. Preparación de nucleósidos de 2,6-Diaminopurina sin el uso de codisolventes

La preparación de nucleósidos de 2,6-Diaminopurina sin usar codisolventes solo pudo realizarse a temperaturas por encima de 80°C debido a la baja solubilidad en agua de esta base púrica. Los ensayos fueron realizados a diferentes temperaturas (80, 90 y 100°C). Se añadieron 12 unidades/ml de lisado celular a 150 ml de una solución mantenida termostáticamente a la temperatura seleccionada y que tenía la siguiente composición de soluciones de sustrato:

- 45 1. 15 mM de uridina/2'-Desoxiuridina,
2. 5 mM de 2,6-Diaminopurina, y
3. 30 mM de tampón de fosfato de potasio, pH 7.

Después de 5 horas, la mezcla de reacción se filtró centrifugación a 2000 ×g durante 30 min, a 4°C, usando un Amicon ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, MA) con un tamaño de corte de 3000 Da y se recuperó el filtrado. En la tabla 3, se muestran los rendimientos de producción de nucleósidos de 2,6-Diaminopurina preparados en presencia de codisolventes. Los nucleósidos de 2,6-diaminopurina (2,6-diaminopurina ribósido o 2,5-diaminopurina desoxiribósido) resultantes se analizaron mediante HPLC. En la tabla 4 se muestran los rendimientos de producción de nucleósidos de 2,6-Diaminopurina preparados en ausencia de disolventes orgánicos. El rendimiento de bioconversión de la reacción fue de alrededor del 80% a todas las temperaturas ensayadas.

Tabla 4. Rendimientos de la producción de nucleósidos de 2,6-Diaminopurina a diferentes temperaturas sin coisolventes orgánicos.

Temperatura (°C)	80	90	100
Biotransformación (%)	79,3	79,6	81,1

5

Ejemplo 13

Preparación de otros nucleósidos

10

Las reacciones de transglicosilación se llevaron a cabo usando varias basesceptoras. Las reacciones se llevaron a cabo a 80°C durante varios periodos de tiempo con DMSO al 10% como codisolvente para las bases púricas y sin codisolventes para las basesceptoras pirimidínicas. El porcentaje de bioconversión se calculó en relación a la concentración inicial de la base aceptora y se determinó mediante análisis por HPLC de la mezcla de reacción

15

13.1 Preparación de nucleósidos de trifluorometiluracilo

Se añadió un mililitro de catalizador (lisado celular) con actividad de transglicosilación de aproximadamente 12 unidades/ml de lisado celular a 150 ml de una solución mantenida termostáticamente a 80°C y que tenía la siguiente composición:

20

- 7,5 mM de uridina/2'-Desoxiuridina,
- 2,5 mM de trifluorometiluracilo, y
- 30 mM de tampón fosfato de potasio, pH 7.

25

Después de 3 horas a 80°C, la mezcla de reacción se filtró por centrifugación a 2000 ×g durante 30 min, a 4°C, usando un Amicon ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, MA) con un tamaño de corte de 3000 Da y se recuperó el filtrado. El rendimiento de bioconversión de la reacción fue superior al 60%. Los nucleósidos de trifluorometiluracilo resultantes (trifluorometiluridina o 2'-desoxitri-fluorometiluridina) se analizaron mediante HPLC.

30

13.2 Preparación de nucleósidos de 5-fluoruracilo

Se prepararon nucleósidos de 5-fluorouracilo tal como se ha descrito previamente. Se añadió un mililitro de catalizador (lisado celular) con actividad de transglicosilación de aproximadamente 12 unidades/ml de lisado celular a 150 ml de una solución mantenida termostáticamente a 80°C y que tenía la siguiente composición:

35

- 7,5 mM de uridina/2'-Desoxiuridina,
- 2,5 mM de 5-fluorouracilo y
- 30 mM de tampón fosfato de potasio, pH 7.

40

Después de 3 horas a 80°C, la mezcla de reacción se filtró por centrifugación a 2000 ×g durante 30 min, a 4°C, usando un Amicon ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, MA) con un tamaño de corte de 3000 Da y se recuperó el filtrado. El rendimiento de bioconversión de la reacción fue superior al 50%. Los nucleósidos de 5-fluorouracilo resultantes (5-fluorouridina y 5-fluoro-2'-desoxiuridina) se analizaron mediante HPLC.

45

13.3 Preparación de nucleósidos de *trans*-Zeatina

Se prepararon nucleósidos de *trans*-zeatina tal como se ha descrito previamente. Se añadió un mililitro de catalizador (lisado celular) con actividad de transglicosilación de aproximadamente 12 unidades/ml de lisado celular a 150 ml de una solución mantenida termostáticamente a 80°C y que tenía la siguiente composición:

50

- 7,5 mM de uridina/2'-Desoxiuridina,
- 2,5 mM de *trans*-zeatina y
- 30 mM de tampón fosfato de potasio, pH 7.

55

Los ensayos se realizaron en DMSO al 10% (v/v) como codisolvente utilizando las condiciones descritas anteriormente. Después de 5 horas a 80°C, la mezcla de reacción se filtró por centrifugación a 2000 ×g durante 30 min, a 4°C, usando un Amicon ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, MA) con un tamaño de corte de 3000 Da y se recuperó el filtrado. El rendimiento de bioconversión de la reacción fue superior al 80%. Los nucleósidos de *trans*-zeatina resultantes (*trans*-zeatina ribósido y *trans*-zeatina desoxiribósido) se analizaron mediante HPLC.

60

13.4 Preparación de nucleósidos de 2-cloro-6-metilaminopurina.

Se prepararon nucleósidos de 2-cloro-6-metilaminopurina tal como se ha descrito previamente. Se añadió un mililitro de catalizador (lisado celular) con actividad de transglicosilación de aproximadamente 12 unidades/ml de lisado celular a 150 ml de una solución mantenida termostáticamente a 80°C y que tenía la siguiente composición:

- 15 mM de uridina/2'-Desoxiuridina,
- 5 mM de 2-cloro-6-metilaminopurina y
- 30 mM de tampón fosfato de potasio, pH 7.

Los ensayos se realizaron en DMSO al 10% (v/v) como codisolvente utilizando las condiciones descritas anteriormente. Después de 5 horas a 80°C, la mezcla de reacción se filtró por centrifugación a 2000 ×g durante 30 min, a 4°C, usando un Amicon ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, MA) con un tamaño de corte de 3000 Da y se recuperó el filtrado. El rendimiento de bioconversión de la reacción fue superior al 80%. Los nucleósidos de 2-cloro-6-metilaminopurina resultantes (2-cloro-6-metilaminopurina ribósido y 2-cloro-6-metilaminopurina desoxiribósido) se analizaron mediante HPLC.

13.5 Preparación de nucleósidos de 6-dimetilaminopurina

Se prepararon nucleósidos de 6-dimetilaminopurina tal como se ha descrito previamente. Se añadió un mililitro de catalizador (lisado celular) con actividad de transglicosilación de aproximadamente 12 unidades/ml de lisado celular a 150 ml de una solución mantenida termostáticamente a 80°C y que tenía la siguiente composición:

- 15 mM de uridina/2'-Desoxiuridina,
- 5 mM de 6-dimetilaminopurina y
- 30 mM de tampón fosfato de potasio, pH 7.

Los ensayos se realizaron en DMSO al 10% (v/v) como codisolvente utilizando las condiciones descritas anteriormente. Después de 5 horas a 80°C, la mezcla de reacción se filtró por centrifugación a 2000 ×g durante 30 min, a 4°C, usando un Amicon ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, MA) con un tamaño de corte de 3000 Da y se recuperó el filtrado. El rendimiento de bioconversión de la reacción fue superior al 80%. Los nucleósidos de 6-dimetilaminopurina resultantes (6-dimetilaminopurina ribósido y 6-dimetilaminopurina desoxiribósido) se analizaron mediante HPLC.

13.6 Preparación de nucleósidos de 6-mercaptopurina

Se prepararon nucleósidos de 6-mercaptopurina tal como se ha descrito previamente. Se añadió un mililitro de catalizador (lisado celular) con actividad de transglicosilación de aproximadamente 12 unidades/ml de lisado celular a 150 ml de una solución mantenida termostáticamente a 80°C y que tenía la siguiente composición:

- 15 mM de uridina/2'-Desoxiuridina,
- 5 mM de 6-mercaptopurina y
- 30 mM de tampón fosfato de potasio, pH 7.

Los ensayos se realizaron en DMSO al 10% (v/v) como codisolvente utilizando las condiciones descritas anteriormente. Después de 5 horas a 80°C, la mezcla de reacción se filtró por centrifugación a 2000 ×g durante 30 min, a 4°C, usando un Amicon ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, MA) con un tamaño de corte de 3000 Da y se recuperó el filtrado. El rendimiento de bioconversión de la reacción fue superior al 50%. Los nucleósidos de 6-mercaptopurina resultantes (6-mercaptopurina ribósido y 6-mercaptopurina desoxiribósido) se analizaron mediante HPLC.

Referencias

1. Van Rompay A, Johansson M, & Karlsson A (2003) Substrate specificity and phosphorylation of antiviral and anticancer nucleoside analogues by human deoxyribonucleoside kinases and ribonucleoside kinases. (traducido del inglés) *Pharmacol Ther* 100(2):119-139 (en inglés).
2. Yu X, Li G, Qi X, & Deng Y (2005) Stereoselective synthesis of 9-beta-d-arabianofuranosyl guanine and 2-amino-9-(beta-d-arabianofuranosyl)purine. (Traducido del inglés) *Bioorg Med Chem Lett* 15(3):683-685 (en inglés).
3. Hutchinson, Trends Biotechnol. 8, 348-353, 1990
4. EP1141328, Keryos Spa
5. Taran SA, Verevkin KN, Esikova TZ, Feofanov SA, & Miroshnikov AI (2008) [Synthesis of 2-chloro-2'-deoxyadenosine by microbiological transglycosylation using a recombinant Escherichia coli strain]. (Traducido del ruso) *Prikl Biokhim Mikrobiol* 44(2):181-186 (en ruso).
6. Cacciapuoti G, et al. (2009) Purine nucleoside phosphorylases from hyperthermophilic Archaea require a CXC motif for stability and folding. *FEBS J* 276(20):5799-5805
7. Cacciapuoti G, et al. (2005) A novel hyperthermostable 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase from the

- archaeon *Sulfolobus solfataricus*. (Traducido del inglés) *FEBS J* 272(8):1886-1899 (en inglés).
8. Cacciapuoti G, *et al.* (2007) Biochemical and structural characterization of mammalian-like purine nucleoside phosphorylase from the Archaeon *Pyrococcus furiosus*. (Traducido del inglés) *FEBS J* 274(10):2482-2495 (en inglés).
- 5 9. Brown, S.H. and Kelly, R.M. (1993) Characterization of Amylolytic Enzymes, Having Both alpha-1,4 and alpha-1,6 Hydrolytic Activity, from the Thermophilic Archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Appl Environ Microbiol* 59, 2614-2621.
- 10 10. Fujiwara, S., Lee, S.G., Haruki, M., Kanaya, S., Takagi, M. and Imanaka, T. (1996) Unusual enzyme characteristics of aspartyl-tRNA synthetase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1. *FEBS Lett* 394, 66-70.
11. Purcarea, C., Simon, V., Prieur, D. and Hervé, G. (1996) Purification and characterization of carbamoyl-phosphate synthetase from the deep-sea hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus abyssi*. *Eur J Biochem* 236, 189-199.
- 15 12. Cacciapuoti, G., Fusco, S., Caiazza, N., Zappia, V. and Porcelli, M. (1999) Heterologous expression of 5'-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the recombinant protein and involvement of disulfide bonds in thermophilicity and thermostability. *Protein Expr Purif* 16, 125-135.
13. Bzowska A, Kulikowska E, & Shugar D (2000) Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. (Traducido del inglés) *Pharmacol Ther* 88(3):349-425 (en inglés).
- 20 14. Saunders, P.P., Wilson, B.A. and Saunders, G.F. (1969) Purification and comparative properties of a pyrimidine nucleoside phosphorylase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* 244, 3691-3697.
15. She Q, *et al.* (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. (Traducido del inglés) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14):7835-7840 (en inglés).
16. Kawarabayasi Y, *et al.* (1999) Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. (Traducido del inglés) *DNA Res* 6(2):83-101, 145-152 (en inglés).
- 25 17. Yanisch-Perron C, *et al.* (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 33(1):103-19

REIVINDICACIONES

1. Vector de expresión recombinante que comprende: la secuencia que codifica una purina nucleósido fosforilasa (PNPasa, E.C. 2.4.2.1) con la secuencia que codifica una uridina fosforilasa (UPasa, E.C. 2.4.2.3); cada una de las secuencias unida operativamente con una o más secuencias de control que dirigen la producción de dichas fosforilasas en un hospedador de expresión adecuado; originándose dichas secuencias de la clase Archaea Thermoprotei, caracterizado porque la PNPasa es de *Sulfolobus solfataricus* (SEQ ID NO. 7) y la UPasa es de *Aeropyrum pernix* (SEQ ID NO. 8) y porque dicho hospedador de expresión adecuado es la cepa bacteriana BL21 de *E. coli*; y además porque dicho vector comprende un promotor T7 que permite la unión de ARN polimerasa T7, un operador lac que permite la inhibición de la expresión cuando el isopropiltiogalactopiranosido (IPTG) no está presente y tioredoxina con parche de histidinas.
2. Célula hospedadora de *E. coli* que comprende el vector de expresión recombinante según la reivindicación 1.
3. Lisado obtenido mediante el lisado de la célula hospedadora, según la reivindicación 2.
4. Procedimiento de transglicosilación entre una nucleobase unida a un azúcar ribosa o desoxirribosa a través de un enlace beta-glicosídico y una nucleobase o nucleobase modificada en presencia de iones fosfato, caracterizado porque dicho procedimiento comprende la utilización de una purina nucleósido fosforilasa de *Sulfolobus solfataricus* (SEQ ID NO. 7) con una uridina fosforilasa de *Aeropyrum pernix* (SEQ ID NO. 8), caracterizado porque dichas fosforilasas son producidas por el vector de expresión recombinante según la reivindicación 1.
5. Procedimiento de transglicosilación, según la reivindicación 4, en el que la UPasa de *Aeropyrum pernix* y la PNPasa de *Sulfolobus solfataricus* son proporcionadas por una célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 2-3.
6. Procedimiento de transglicosilación, según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en el que los productos obtenidos son principios activos farmacéuticos (API) o intermedios de los mismos.
7. Procedimiento de transglicosilación, según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en el que la nucleobase unida a un azúcar ribosa o desoxirribosa a través de un enlace beta-glicosídico se selecciona entre nucleósidos naturales o modificados que contienen D-ribosa o 2'-desoxirribosa; nucleósidos que contienen el grupo ribosa modificado en las posiciones 2', 3' y/o 5'; y nucleósidos en los que el azúcar es beta-D-arabinosa, alfa-L-xilosa, 3'-desoxirribosa, 3',5'-didesoxirribosa, 2',3'-didesoxirribosa, 5'-desoxirribosa, 2',5'-didesoxirribosa, 2'-amino-2'-desoxirribosa, 3'-amino-3'-desoxirribosa o 2'-fluoro-2'-desoxirribosa.
8. Procedimiento de transglicosilación, según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en el que la nucleobase o nucleobase modificada se selecciona entre bases pirimidínicas y púricas naturales o sustituidas; bases púricas sustituidas en una o más de las posiciones 1, 2, 6; bases pirimidínicas sustituidas en una o más de las posiciones 3, 5; y purina, 2-azapurina, 8-azapurina, 1-deazapurina (imidazopiridina), 3-deazapurina, 7-deazapurina, 2,6-diaminopurina, 5-fluorouracilo, 5-trifluorometiluracilo, *trans*-zeatina, 2-cloro-6-metilaminopurina, 6-dimetilaminopurina, 6-mercaptapurina.
9. Procedimiento de transglicosilación, según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en el que dicho procedimiento se lleva a cabo entre 60°C y 100°C.
10. Procedimiento de transglicosilación, según cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en el que dicho procedimiento se lleva a cabo en medio acuoso o en un sistema de codisolventes polares apróticos.
11. Procedimiento de transglicosilación, según la reivindicación 10, en el que el sistema de codisolventes polares apróticos se selecciona entre dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, 2- metiltetrahidrofurano, y dimetilformamida.
12. Procedimiento de transglicosilación según cualquiera de las reivindicaciones 4-11, en el que el nucleósido donador de azúcar se selecciona ente uridina y 2'-desoxiuridina y la base aceptora se selecciona entre 2,6-diaminopurina, 5-fluorouracilo, 5-trifluorometiluracilo, *trans*-zeatina, 2-cloro-6-metilaminopurina, 6-dimetilaminopurina y 6-mercaptapurina.

Figura 1

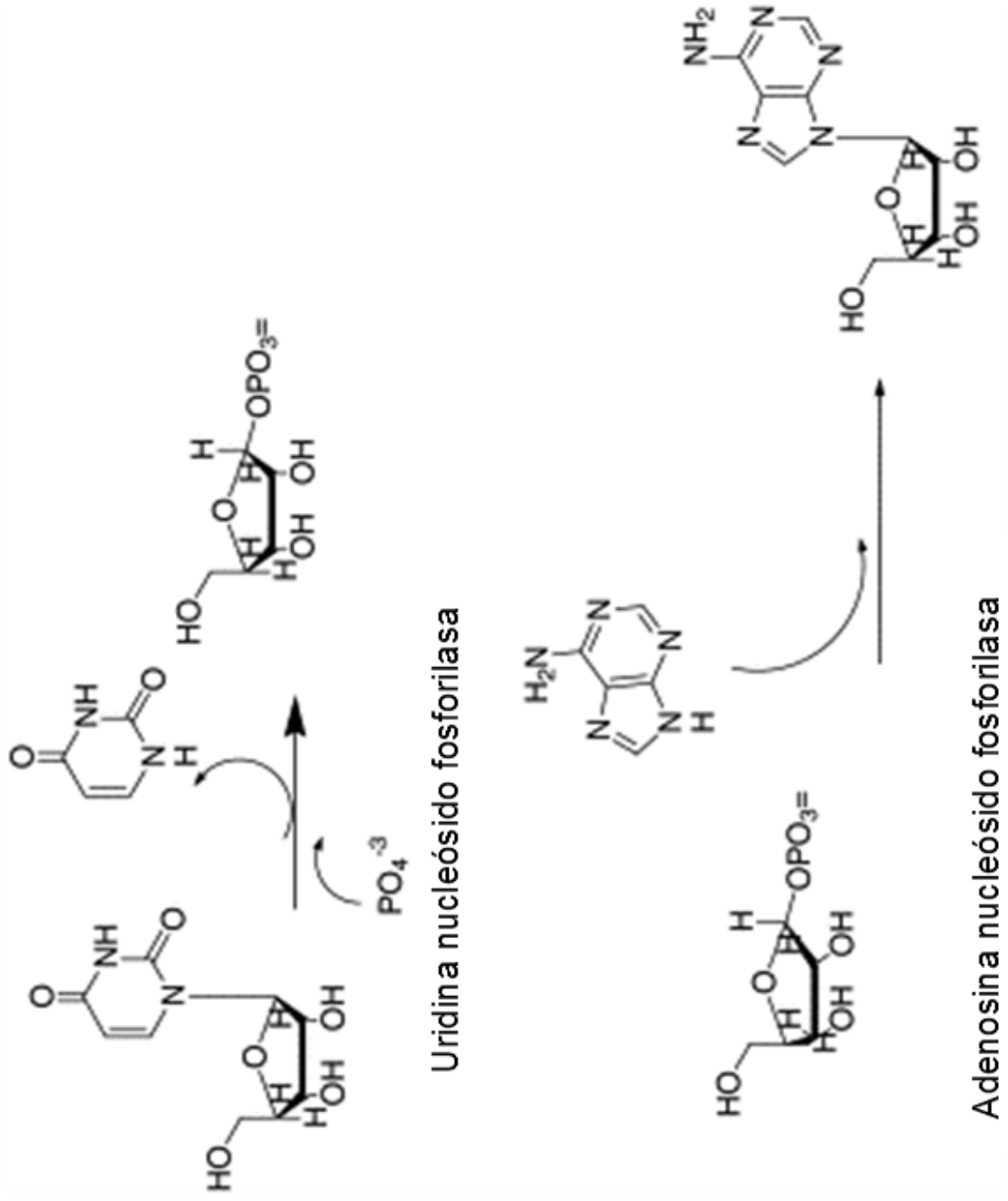


Figura 2

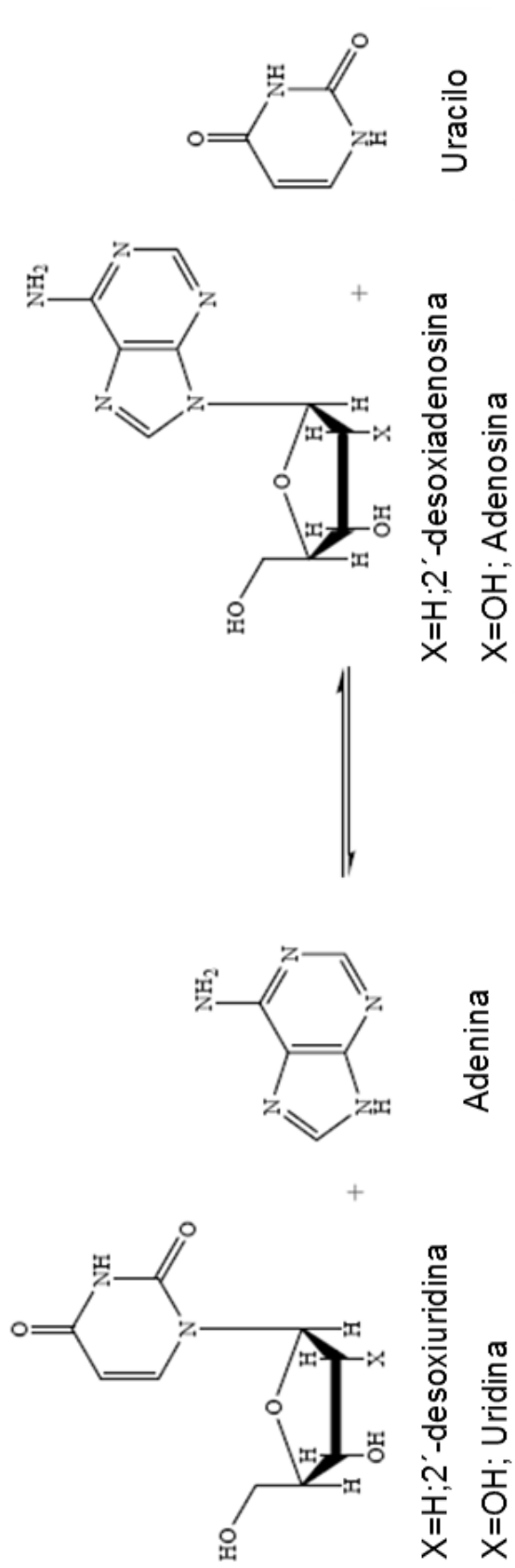


Figura 3

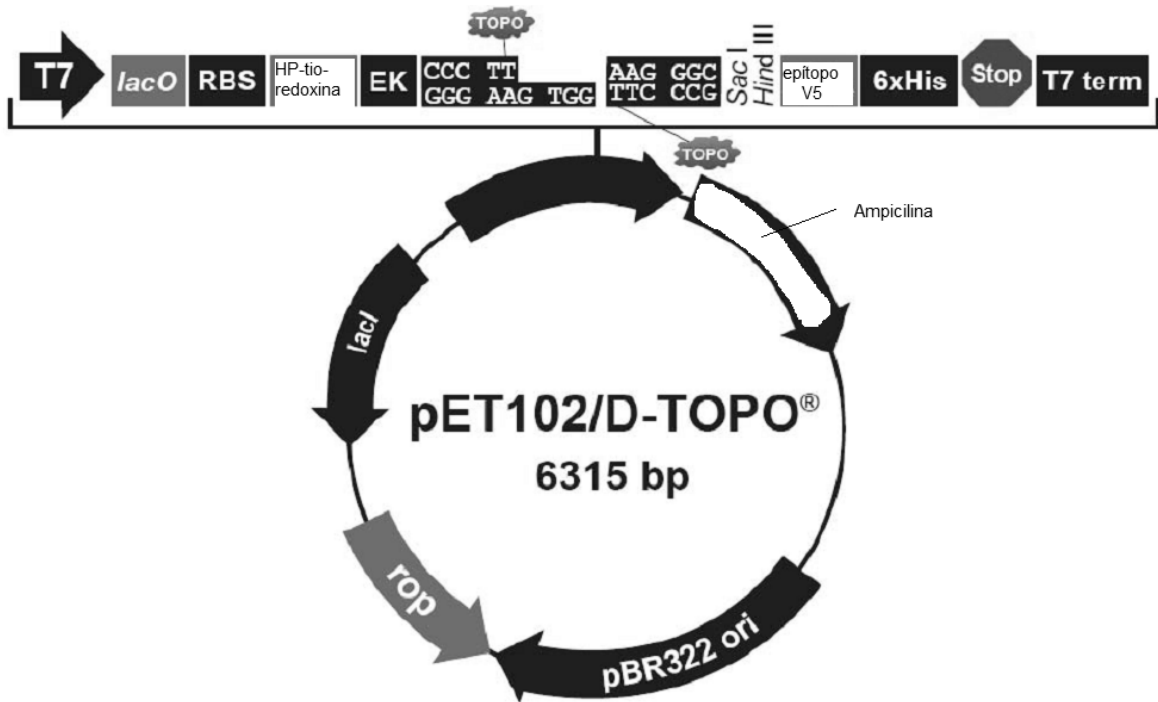


Figura 4

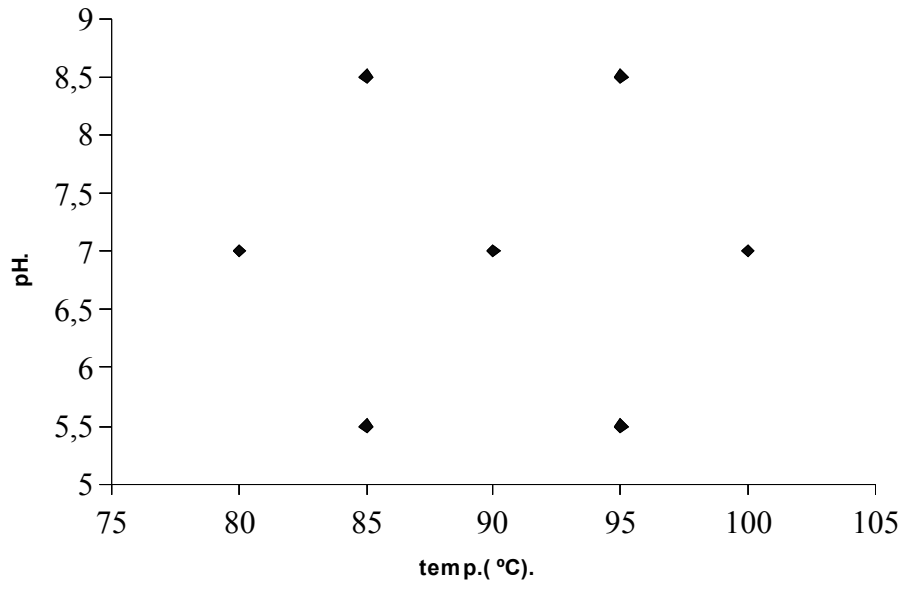


Figura 5.

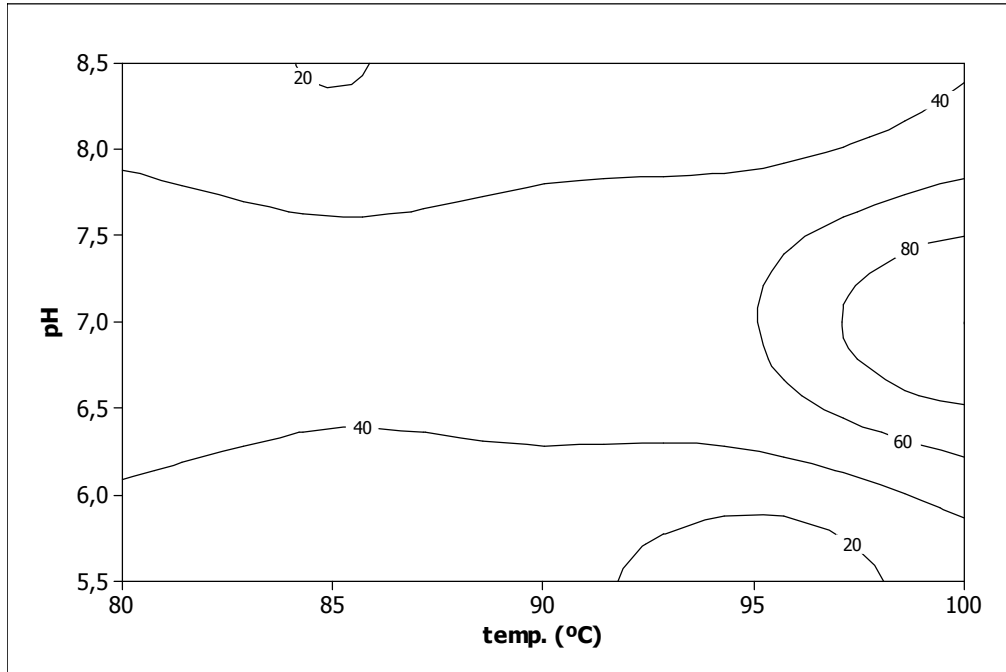


Figura 6.

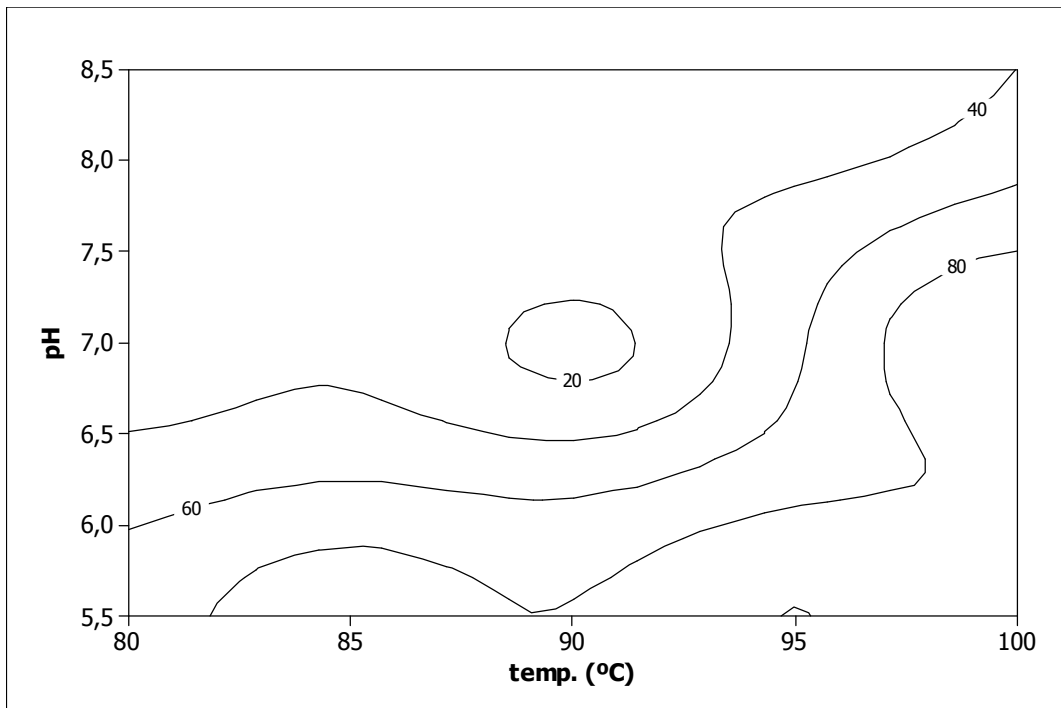


Figura 7.

1 gtgccatfff tagaaaatgg ttccatggta tatgggtgatt tcattagaaa tcaagaggta
 5 61 agaaaaagaa ttacaaagga agaactggg atagaagaag acgaaatccc ggaaaggga
 121 gttgtaacac ctatgccatt taatactcaa tttcctaaaa actttgaaga tactttaact
 181 aacttaggaa ttaaagtaaa taggttaaaa gtggaagacc aaatacttag acaattcgga
 241 ggaaatttat tgctgaaaa agacggtaat agaggatta ttgcgttcat aggcagagg
 301 ctgatagatt tcaactgagag gataaggatt ttactacag ttccgcgcat taaagatata
 361 ttatttattg gtactgcagg atcgttatct aatgaaatata taataggaga tctaaatata
 10 421 ccaaaaatag ccatcccatt cgaaaacgta agtgattfff acgctgatcc taccatagca
 481 attccacaag ctgatgaaaa gttgctgaac gaagttatg agtacgctga ggaaactgga
 541 gttaaaacc actcaacctt acatgcaaca ctactttcc ctattccga aactactgag
 601 ttctaaact acttataaa tatcggcgtt tctacgatag atatggaagt cagtgtttt
 661 tataagatgt ctgatffta cggtaaaaga gctgttcag tattacgaat ttcagatag
 15 721 cctttaatag aactgcataa gcaagaggaa ttgattaagg caagaaggga aattgcagtt
 781 aatgctgttt tcagaattac ctaagattc taaaactga ttaa

Figura 8

20 1 gtggcccgt acgttctct cccgggagac cccgagagga cagacctat agcccgcctc
 61 tgggatgaag cgaggctgt agcgcaccac cgggagtaca ggacgtggac cggcttctac
 121 aaggggacat cgataagtgt aacaagcacc gggataggct ctcccagcac ggcgatagcc
 181 gttgaggagc tgctgagggt tggagccgag acttcataa gagtaggcac tatgggagg
 241 ataaggagg atctgcggcc cggcaccctg gttatagga gtgcggcggg taggatggag
 25 301 gggacgagcg gccagtacg tcccggggg ttccagcgg ccgacagcta tgacgttg
 361 gcggcgctg tggaggctgc tgaggcgtc ggggttaggt atgaggttg cgtgttgcc
 421 agcacggaca gcttctacct gggccagggg aggccgggg acgggggga tatgacgcc
 481 gaggttcgg aagtcatacc cctcctcagg tcagccggcg tctcggctt cgagatggag
 541 gcctccgcc tctcaccct atcccagctc tacggcgcca ggcaggggtg cgtgtgcg
 30 601 gtatggcaa acagggtag cggggagttt gtggtaaacg cgggggtga agacgctgct
 661 aggtgtcct ccgaggggt agccatacta gcaggctgg acagggagag ggagaagagg
 721 ggtaagaaat ggtttacc gagcctggcg tgcagacgca catag