



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 241 487**

② Número de solicitud: 200400817

⑤ Int. Cl.

C12P 19/38 (2006.01)

C12P 19/40 (2006.01)

C12P 19/28 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

② Fecha de presentación: **02.04.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2005**

Fecha de la concesión: **28.04.2006**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.06.2006**

⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.06.2006

⑦ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado, Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Sinisterra Gago, José Vicente;
Condezo Hoyos, Luis Alberto y
Fernández Lucas, Jesús**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento para la síntesis de nucleósidos mediante la utilización de microorganismos psicrotrofos o psicrotolerantes.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para la síntesis de nucleósidos mediante la utilización de microorganismos psicrotrofos o psicrotolerantes.

La presente invención se refiere a la síntesis de nucleósidos purínicos, nucleósidos pirimidínicos derivados de 5'-fluoruracilo y 5'-clorouracilo o triazoles, por intercambio de bases, mediante la utilización de microorganismos psicrotrofos o psicrotolerantes. La reacción ocurre partiendo de nucleósidos de uracilo, en un solo paso, a menor temperatura que la utilizada hasta ahora, no observándose reacciones secundarias de degradación del nucleósido formado.

Los microorganismos seleccionados son *Bacillus psychrosaccharolyticus*; *Bacillus subtilis* ssp. *niger*; *Photobacterium leiognathi*; *Photobacterium phosphoreum*; *Psychrobacter immobilis*.

ES 2 241 487 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la síntesis de nucleósidos mediante la utilización de microorganismos psicrotrofos o psicroterantes.

5

Sector de la técnica

La presente invención, según se expresa en esta memoria descriptiva, se refiere a la utilización de microorganismos psicrotrofos en la síntesis de nucleósidos por intercambio de bases. El proceso es válido para la obtención de nucleósidos naturales, o no naturales, con buenos rendimientos y enantioselectividades. Estos compuestos tienen interés como medicamentos genéricos de actividad antiretroviral, antitumoral o para la terapia antisentido. Derivados de estos nucleósidos obtenidos mediante modificaciones simples se pueden utilizar en la inhibición de la difusión facilitada de nucleósidos naturales para el tratamiento de ciertas leucemias, agonistas de receptores A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃, antiinflamatorios, enfermedad de Huntington, taquicardias, etc. Su aplicación es en el campo de la Industria Farmacéutica y en la Industria Veterinaria.

15

Estado de la técnica

Los análogos de nucleósidos naturales presentan muchas aplicaciones en terapéutica. Entre ellas, las más contrastadas son el tratamiento de enfermedades de origen viral (Dimoglo A.S.; Gorbachov M.Y.; Lesnik T.I.; Saragoglu M.; Yildirich I.- *Current Medicinal Chemistry* 1977, **4**, 23-34) y el tratamiento de diversas neoplasias (Sanders P.P.; Kutan R.; Lay M.M.; Robins R.K.- *Mol. Pharmacol.* 1983, **23**, 534-538).

20

A partir de 1985 - cuando se descubre que el AZT (3'-azido-3'-desoxitimina) inhibe la replicación de los virus HIV-1 y HIV-2 *in vitro* - han sido innumerables las moléculas análogas diseñadas para combatir el SIDA, donde los 2',3'-didesoxinucleósidos constituyen la principal arma terapéutica contra este tipo de virus. Sin embargo, los efectos tóxicos colaterales: discrasias sanguíneas, pancreatitis, neuropatías periféricas, así como la aparición de resistencias a estos fármacos (AZT, ddl y ddC) siguen siendo los mayores inconvenientes de este tipo de tratamientos. Esto se está intentado solventar con el diseño de nuevos agentes potenciales anti-HIV de estructura nucleosídica.

25

La importancia económica y social de este tipo de fármacos es bien patente. Para ello solo hay que recordar las enfermedades contra las cuales se utilizan - cáncer, SIDA, herpes, etc. - y los elevados precios de estos fármacos. Su principal consumo está ligado a la Farmacia Hospitalaria y a los centros de atención de enfermos de SIDA por lo cual su montante real en ventas no se refleja en su justa medida en las tablas de fármacos más vendidos en las Oficinas de Farmacia. Otros ejemplos de este tipo de fármacos, muy empleados en estos centros son la Zidovudina (ZDV (Retrovir)), Nelfinavir (Virazep, AG1343), Aziclovir (Zovirax), (Ruiz Camps I. Inhibidores de transcriptasa inversa, *El farmacéutico de Hospitales*. Informe 8 n° 89 1999) etc.

30

35

En estos casos la actividad terapéutica se encuentra relacionada con la alteración del proceso de síntesis de ADN o de ARN.

40

No obstante, existen otras dianas farmacológicas frente a las que son activos los nucleósidos de síntesis. Entre ellas citaremos:

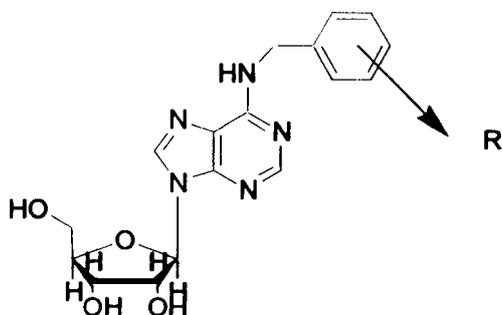
45

- 1) Inhibición de la difusión facilitada de nucleósidos naturales. Esta metodología se utiliza en el tratamiento de ciertas leucemias humanas. Buolamwimi J.K.- *Current Medicinal Chem.* 1997, **4**, 35-66). Las estructuras son del tipo:

50

55

60



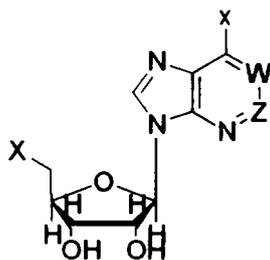
que pueden obtenerse fácilmente a partir de adenosina.

65

- 2) Agonistas de receptores A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ de adenosina, de estructura general (Muller C.E.-*Current Medicinal Chem.* 2000, **7**,1269-1288):

5

10



15

Estos compuestos son inhibidores de adenosina kinasa o inhibidores alostéricos de los receptores de adenosina. Por ello tienen aplicación en el tratamiento de la taquicardia supraventricular, enfermedad de Huntington, etc.

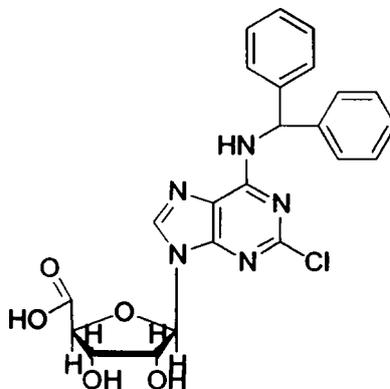
- 3) Nucleósidos activos en el tratamiento de los procesos inflamatorios. Estos nucleósidos tienen como estructura general:

20

25

30

35



40

que también puede obtenerse fácilmente a partir de adenosina. Estos nucleósidos se obtienen oxidando los ribonucleósidos convencionales con monooxigenasas (Mahamoudian M.-Biocatalysis & Biotransformations 2000, 18, 105-118).

45

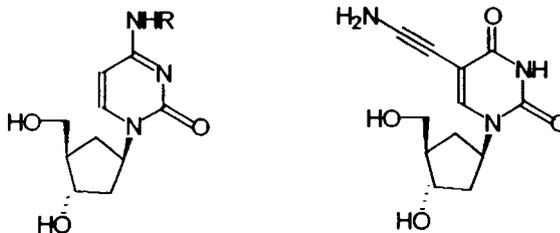
- 4) Formación de triples hélices de ADN que permiten obtener nucleósidos antisentido con una extensa secuencia de reconocimiento (Fox K.R.-Current Medicinal Chem. 2000, 7, 17-37; Ganesh K.N.; Rajeev K.G.; Pallan P.S.; Rana V.S.; Barawkar D.A.; Kumar V.A.-Nucleoside & Nucleotides 1997, 16, 12-71; Bijapur J.; Keppler M.D.; Bergquist S.; Brown T.; Fox K.R.-Nucleic Acids Research 1999, 27, 1802-1807; Mercola D.; Cohen J.S. Cancer Gene Therapy 1995, 2, 47-53).

50

- 5) Estos compuestos poseen estructuras del tipo:

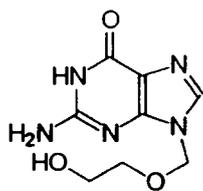
55

60

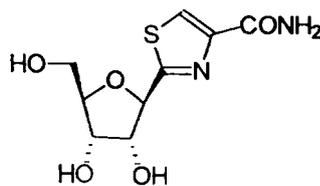


65

Ejemplos significativos lo constituyen el aciclovir y la tiazofurina:



Aciclovir



Tiazofurina

Todo ello justifica por qué en los últimos años, se han realizado innumerables esfuerzos para lograr la síntesis a gran escala de nucleósidos con actividad biológica. Éstas se pueden dividir en dos grandes grupos:

A.- Síntesis químicas

B.- Síntesis químio-enzimáticas

A.- Síntesis químicas

La síntesis químicas escalables y generalizables a todo tipo de nucleósido, parten del azúcar o de un análogo funcionalizado en C-1 con un grupo saliente que reacciona con el heterociclo previamente formado. Aunque se han desarrollado muchos métodos de síntesis, en especial en el caso de los derivados purínicos, la compleja estructura de estas moléculas, su inestabilidad, y su polifuncionalidad hacen que se requiera un elevado número de pasos de síntesis para su preparación, incluidos los de protección y desprotección de grupos funcionales reactivos. Además, es difícil el control de la configuración anomérica y la formación regioespecífica de la unión glicosídica C-N cuando existen varios posibles grupos nucleofílicos en las bases (Paf S. and Nair V.; *Biotechnol. Letters*, 1997, **19**, 349; Wong C.H., Halcomb R.L., Ichikawa Y. and Kajimoto T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 511).

Por ello, las síntesis químicas conducen a una mezcla de compuestos isómeros, donde la separación del producto buscado puede ser tediosa y complicada obteniéndose rendimientos de bajos a moderados en producto final lo cual reduce la rentabilidad económica del proceso.

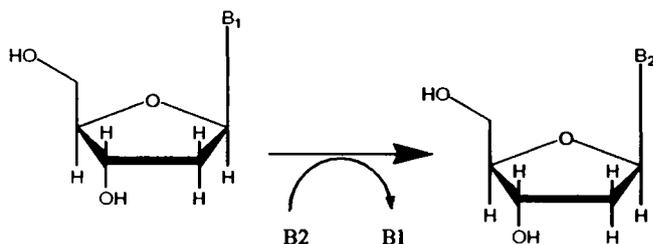
B.- Síntesis químio-enzimática

La síntesis de nucleósidos catalizada por enzimas puede ser una alternativa a las llevadas a cabo por métodos químicos ya que no se requieren grupos protectores y usualmente transcurren con alta regio - y estereoespecificidad (Wong C.H. Whitesides G.M., *Enzymes in organic synthetic chemistry*, Elsevier Science Ltd., Oxford, Cap.1 (1994); Hanrahan J.R., Hutchinson D.W.; *J. Biotechnol.* 1992, **23**, 193.) lo cual simplifica los procesos de separación del producto final de los productos secundarios de reacción. La alta eficiencia catalítica de las enzimas y su moderada especificidad por sustrato en procesos *in vitro* permiten que las reacciones se lleven a cabo sobre análogos de sustratos naturales, utilizando tanto disolventes orgánicos hidrófilos como hidrofóbicos.

La aplicación de las enzimas libres a la síntesis de nucleósidos ha sido revisada en dos recientes trabajos de Ferrero y Gotor (Ferrero M.; Gotor V.-*Monatsh Chem* 2000, **131**, 585-616; Idem.- *Chemical Rev.* 2000, **100**, 4319-4347). Entre ellas hay que citar las enzimas que catalizan la formación de uniones glicosídicas por transferencia del azúcar de una base donadora a una base aceptora (glicosiltransferasas y nucleósidofosforilasas).

B.I.- 2'-Desoxiribosiltransferasas

Estas enzimas son específicas de 2'-desoxiribosa y son abundantes en especies del género *Lactobacillus* como *L. leichmanii* (Carson D. A. y Wasson D.B.- *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1989, **155**, 829-839; Stoecker J.D., Poirot A.F., Smith R.M., Parks R.E., Ealick S.E., Takabayashi K., Erion M.D., *Biochemistry* 1997, **36** 11749) y *L. helveticus*. (Krenitsky T., Koszalka G., Tuttle J., *J. Biochemistry.* 1981, **20**, 3615-3618). Hay dos subclases de enzimas según sea su mecanismo de acción.



ES 2 241 487 B2

Donde B1 y B2 son dos bases distintas.

Tipo I

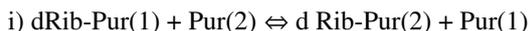
5 Catalizan la transferencia de bases solamente entre purinas



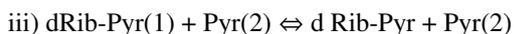
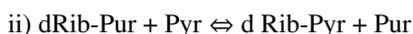
Tipo II

10

Catalizan la transformación entre purinas y/o pirimidinas



15



20

d Rib = 2'-desoxi-D-ribosa

Pur- = base púrica

Pyr = base pirimidínica

25

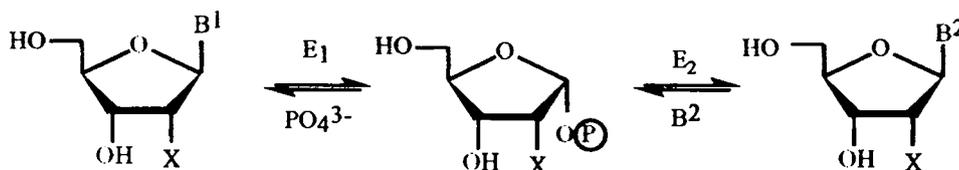
B.II.-Nucleósido fosforilasas

Estas enzimas catalizan la fosforólisis reversible de ribo o desoxiribonucleósidos con la formación de ribosa o 2'-desoxiribosa-1-fosfato, y la base correspondiente. Se conocen purín (EC 2.4.2.1) y pirimidín (EC 2.4.2.2, EC2.4.2.3 y EC 2.4.2.4) nucleósido fosforilasas (Burns Ch L., Clair M.H., Frick L.Y.; Spector Th., Averett D.R., English L.M., Holmes T.H., Krenitsky T., Koszalka G.W., *J. Med. Chem.* 1993, **36**, 378-384; Shirae H., Yokozeki K., Uchiyama M., Kubota, K. *Agric. Biol. Chem.* 1988, **52**, 1777-1783; Lewkowicz E.S.; Martínez N.; Rogert M.C.; Porro S.; Iribarren A.M.- *Biotcehnol.Lett.* 2000, **23**, 1277-1280), que pueden ser de origen bacteriano o de tejidos de mamíferos.

Las nucleósido fosforilasas de mamíferos no aceptan adenosina pero sí inosina, uridina y guanosina como sustrato (Hanrahan J.R., Hutchinson D.W.; *J. Biotechnol.* 1992, **23**, 193-198). Por el contrario, las enzimas bacterianas aceptan a los tres nucleósidos purínicos (Shirae H., Yokozeki K., Uchiyama M., Kubota, K. *Agric. Biol. Chem.* 1988, **52**, 1777-1783) o a nucleósidos pirimidínicos como uridina Shirae, H., Yokozeki, K. y Kubota, K. *Agric. Biol. Chem.* 1988, **52**, 1499-1505). Esto, unido al rápido crecimiento de las bacterias productoras de estas enzimas y a la sencillez que presenta su fermentación, hace que sean estas últimas enzimas las más utilizadas. Como microorganismos productores de estas enzimas tenemos: *Brevibacterium acetyllicum* ATCC 954 (Nori, N., Watanabe, M., Sungawa, K., Uehara, K. y Mikami, Y. *J.Bacteriol.* 1991, **17**, 121-131), *Erwinia carotovora* AJ 2992 (Feng L., Yoshiharu I., Kimura A. *Applied Environm. Microbiol.* 1990, **56**, 3830-3834), *Bacillus stearothermophilus* JTS 859 (Wielgus-Kutrowska B., Kyulikowska E., Wierzchowski J., Bzowska A., Shugar D., *Eur. J. Biochem.* 1997, **243**, 408.), *E. coli* BL21 (Rogert M.C., Trelles A. J., Porro S., Lewkowicz E. S., Iribarren A.M. *Biocatalysis and Biotransformations.* 2002, **20**, 347-351), *Enterobacter gergoviae* CECT 875 (Trelles A. J.; Fernández M.; Lewkowicz E.S.; Iribarren A.M.; Sinisterra J.V.-*Tetrahedron Asymmetry* 2003, **44**, 2605-2609) etc., que se han empleado en la síntesis de diversos nucleósidos con actividad antiviral. En este grupo también hay que citar la nucleósido fosforilasa de *Klebsiella* sp (Utagawa T., Morisawa H., Yoshinaga F., Yamazaki A., Mitsugi K., Hirose Y., *Agric. Biol. Chem.*, 1985, **49**, 1053) que acepta como sustratos tanto a nucleósidos pirimidínicos como purínicos cuando la célula ha sido cultivada en un medio donde la adenosina era la única fuente de carbono y nitrógeno.

Nucleósido fosforilasas

55



60

Donde	B ¹ : pirimidina	E ₁ : pirimidín nucleósido fosforilasa
	B ² : purina	E ₂ : purín nucleósido fosforilasa
o bien	B ¹ : purina	E ₁ : purín nucleósido fosforilasa
	B ² : pirimidina	E ₂ : pirimidín nucleósido fosforilasa

65

X = H, OH

En la Bibliografía existen trabajos científicos en los que se emplean diversos microorganismos en estos procesos. Entre ellos se destacan *E. coli* y *Bacillus stearothermophilus*. en forma de pastas húmedas de células (Uttagawa, T. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1999, **6**, 215-222; Erion, M.D., Takabayashi, K., Smith, H.B., Kessi, J., Wagner, S., Hönger, S., Shamen, S. L., Ealick, S. E. *Biochemistry* 1997, **6**, 11725-11734; Erion, M.D., Stoeckler, J.D.,
5 Guida, W.C., Walter, R.L. Ealick, S.E.- *Biochemistry*. 1997, **36**, 11735-11748).

Entre las principales limitaciones del empleo de microorganismos mesófilos en esta síntesis destaca la descomposición de los nucleósidos 6-aminopurínicos por la adenosin deaminasa (Rogert M.C., Trelles J.A., Porro S., Lewkowicz E.S., Iribarren A.M. *Biocatalysis and Biotransformations*. 2002, **20**, 347-351). Esta reacción secundaria puede ser
10 reducida, pero no eliminada, trabajando a $T < 60^{\circ}\text{C}$ (Uttagawa, T. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1999, **6**, 215-222; Yokozeki K.; Tsuji T., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **10**, 207-213). Otra limitación es la fuerte dependencia de la estructura del azúcar que limita su aplicación para obtener con un mismo microorganismo diversos nucleósidos con distintos anillos de azúcar.

Los microorganismos empleados en esta invención han sido microorganismos psicrotrofos o psicrotolerantes lo que nos ha permitido bajar la temperatura de reacción. Ninguno de estos microorganismos se ha descrito previamente como productor de este tipo de enzimas. Las enzimas de estos microorganismos pueden trabajar a menores temperaturas que las de los organismos mesófilos convencionales. Los microorganismos son activos desde 15°C a 30°C (Feller G.; Gerday C.- *Cell Mol, Life Science* 1997, **53**, 830-841). Se han descrito solo algunas enzimas hidrolíticas obtenidas a
20 partir de estos microorganismos, fundamentalmente bacterias antárticas. Entre estas podemos citar la: α -amilasa de *Alteromonas haloplanctis* (Feller G.; Zekhnini Z.; Lummotte-Brasseur J.; Gerday C. *Eur. J. Biochem*. 1977, **244**, 186-191), la subtilisina de *Bacillus TA 39* (Feller G.; Payan F.; Theys F., Quian M.; Haser R. And Gerday C. *Alteromonas haloplanctis* A23 *Eur.J. Biochem*. 1994, **222**, 441-447) o la (β -lactamasa de *Psychrobacter immobilis* (Feller G.; Zekhnini Z.; Lummotte-Brasseur J.; Gerday C. *Eur. J. Biochem*. 1977, **244**, 186-191). Estas enzimas presentan un
25 elevado valor de Km por lo que son poco específicas de sustrato.

Explicación de la invención

Procedimiento para la síntesis de nucleósidos mediante la utilización de microorganismos psicrotrofos o psicro-
30 lerantes.

En la presente invención se describe por primera vez el empleo de una serie de microorganismos en la síntesis de nucleósidos por intercambio de bases. La reacción permite la obtención en un solo paso de nucleósidos derivados de 6-mercapto purina, purinas, 2,6-diaminopurina u otros derivados de purina funcionalizadas en 2 y 6, a partir de
35 nucleósidos como uridina, timidina, 2'-deoxiuridina y 2',3'-dideoxiuridina. Asimismo se han obtenido nucleósidos pirimidínicos derivados de 5-fluoruracilo, 5-clorouracilo, timina, etc. y con otras estructuras como triazoles como es el caso de la ribavirina.

La principal ventaja consiste en que la reacción ocurre a temperaturas menores de 60°C , que es la usada tradicionalmente, por lo que no hay formación de hipoxantina o derivados a partir de nucleósidos de 6-aminopurina lo que constituye la principal reacción parásita que disminuye el rendimiento de la reacción.

Los microorganismos empleados en esta invención son: *Aeromonas salmonicida ssp achromogenes* (CECT 895); *Bacillus psychrosaccharolyticus* (CECT 4074); *Bacillus subtilis ssp. niger* (CECT 4071); *Photobacterium damsela*
45 (CECT 626); *Photobacterium leiognathi* (CECT 4191); *Photobacterium phosphoreum* (CECT 4192); *Psychrobacter immobilis* (CECT 4492); *Vibrio alginolyticus* (CECT 436) y *Vibrio mediterranei* (CECT 415). Las cepas se encuentran depositadas en al Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia (Burjassot), Valencia, España).

El medio de fermentación empleado para el cultivo de estos microorganismos fue el siguiente: extracto de carne, extracto de levadura y NaCl en agua desionizada; el pH se ajustó a 7.

Los cultivos pueden crecer en cualquier recipiente apropiado, que podría ser típicamente en un medio sólido de placas Petri o en medios líquidos en matraces de vidrio tipo erlenmeyer. Los cultivos se pueden realizar en un intervalo
55 de temperaturas de 15 a 40°C , ventajosamente de 15 a 30°C y típicamente de 25 a 30°C . Los cultivos líquidos se llevaron a cabo con agitación orbital a 100-350 r.p.m. y típicamente a 200-250 r.p.m.

Las reacciones catalizadas por estos microorganismos se llevaron a cabo con las células recogidas después de haber alcanzado su periodo estacionario de crecimiento. El medio se centrifugó y se separaron las células que se lavaron
60 con un tampón adecuado y se volvieron a recentrifugar. Las células limpias se mezclan con tampón adecuado y los reactivos correspondientes, en distintas relaciones molares. El seguimiento de la reacción se puede hacer mediante diversas técnicas como cromatografía de capa fina (TLC) o cromatografía de alta presión (HPLC).

La estereoquímica de los productos de reacción se puede determinar por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o
65 Dispersión óptica rotatoria (DOR).

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener nucleósidos naturales o no

ES 2 241 487 B2

a partir de otros nucleósidos más baratos empleando células enteras de microorganismos que se describen aquí por primera vez con este fin.

Descripción detallada de la invención

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención pero no son limitativos de su alcance, el cual viene definido exclusivamente por la nota reivindicativa.

Ejemplo 1

Síntesis de 2'-deoxiadenosina a partir de 2'-deoxiuridina empleando células de Bacillus psychrosaccharolyticus CECT 4074

1.a- Cultivo de microorganismos productores de enzimas

1.a.1- Medios de cultivo

Medio de cultivo sólido: Los microorganismos se crecieron en placas Petri, un medio compuesto por 1% (plv) extracto de carne, 0.5% (plv) extracto de levadura y 0.5% (plv) NaCl y agar bacteriológico 2% (p/v), en agua desionizada ajustando el pH a 7 con KOH.

Medio de cultivo líquido: Los microorganismos se crecieron hasta saturación en erlenmeyers de 250 ml conteniendo 50 ml de un medio de cultivo compuesto por 1% (plv) extracto de carne, 0.5% (plv) extracto de levadura y 0.5% (plv) NaCl en agua desionizada ajustando el pH a 7 con KOH.

1.a.2- Cultivo de los microorganismos en medio sólido

Los microorganismos se cultivaron inicialmente en medio sólido. Cuando el cultivo estuvo bien crecido, se raspó la superficie del medio sólido para proporcionar suficientes células como inóculo de los matraces en el paso siguiente.

1.b- Preparación del inóculo mediante el cultivo de los microorganismos en medio líquido

Los microorganismos se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 50 ml de medio de cultivo. La incubación se realizó a 28°C en una bandeja con agitación orbital a una velocidad de 200 r.p.m. Los caldos de cultivo fueron recogidos a 24 hrs.

1.c- Reacciones de síntesis de nucleósidos

Las reacciones se llevaron a cabo a temperaturas entre 50 y 70°C en matraces de vidrio con agitación orbital constante de 200 r.p.m. El tiempo de reacción varió entre 30 min a 21 hrs, según la síntesis a realizar. El caldo de cultivo se centrifugó a 4.000 r.p.m. y a 4°C durante 15 min. El líquido sobrenadante se desechó y la pasta de células se lavó con tampón fosfato 30 mM (pH=7) y se recentrifugó en las mismas condiciones que antes. El lavado se repitió otra vez más.

El análisis del transcurso de la reacción se llevó a cabo por TLC (Cl₃CH/metanol 80:20 (v/v)) o por HPLC.

La pasta de células se mezcló con 10 ml de tampón fosfato 10 mM (pH=7). La reacción se lleva a cabo a 57°C, empleando células de *Bacillus psychrosaccharolyticus*. Las concentraciones de 2'-deoxiuridina y de adenina fueron iguales a 0,5 mM. El volumen de reacción se ajustó a 50 ml. Transcurrida una hora, se separa los microorganismos del medio de reacción centrifugando a 10.000 r.p.m. durante 20 min. a 4°C. La reacción se siguió por HPLC.

El análisis por HPLC se llevó a cabo usando una columna INTERSIL ODS2 5 μm (15 cm x 0.46 cm) (Tecnokroma S.A. España). La longitud de onda fue de 260 nm y la temperatura de la columna fue de 35°C. La fase móvil fue HAcO/NaAcO (pH=5.8)/MeOH (95/5 v/v); Flujo 0.87 ml/min, Presión de 1,800 ± 15 psi. Los tiempos de retención (min) fueron: 2'-deoxiuridina= 5.56; Adenina = 6.42; Hipoxantina =3.65; 2'-deoxyadenosine = 28.5.

La conversión obtenida fue de un 71% con una productividad de 32 x 10⁻⁵ mM/(hr x 10⁶ cel).

Ejemplo 2

Síntesis de 2'-deoxiadenosina a partir de 2'-deoxiuridina empleando células de Psychrobacter immobilis CECT 4492

La síntesis se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 1, pero empleando células de *Psychrobacter immobilis*.

La conversión obtenida fue de un 66% con una productividad de 23 x 10⁻⁵ mM/(hr x 10⁶ cel).

ES 2 241 487 B2

Ejemplo 3

Síntesis de 2'-deoxiadenosina a partir de 2'-deoxiuridina empleando células de Bacillus subtilis ssp níger CECT 4071

5 La síntesis se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 1, pero empleando ahora una concentración de 2'-deoxiuridina de 15 mM y de adenina de 5 mM.

La conversión obtenida fue de un 28% con una productividad de 0.18×10^{-5} mM/(hr x 10^6 células)

10 Ejemplo 4

Síntesis de adenosina a partir de uridina empleando células de Photobacterium phosphoreum CECT 4192

15 La síntesis se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 1, pero empleando células de *Photobacterium phosphoreum*. Las concentraciones de uridina fueron de 5 mM y la de adenina 0,5 mM.

La conversión obtenida fue de un 47% con una productividad de 46×10^{-5} mM/(hr x 10^6 cel).

20 Ejemplo 5

Síntesis de adenosina a partir de uridina empleando células de Photobacterium leiognathi CECT 4191

25 La síntesis se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 4, pero empleando células de *Photobacterium leiognathi*.

La conversión obtenida fue de un 66% con una productividad de 47×10^{-5} mM/(hr x 10^6 cel).

Ejemplo 6

30 *Síntesis de 2'-deoxiadenosina a partir de 2'-deoxiuridina empleando células de Photobacterium leiognathi CECT 4191*

35 La síntesis se realizó en las condiciones descritas para el ejemplo 1, pero empleando las células de *Photobacterium leiognathi*.

La conversión obtenida fue de un 70% con una productividad de 32×10^{-5} mM/(hr x 10^6 cel).

Ejemplo 7

40 *Síntesis de 2',3'-dideoxiadenosina a partir de 2',3'-dideoxiuridina empleando células de Bacillus subtilis ssp níger CECT 4071*

45 La síntesis se realizó en las condiciones descritas para el ejemplo 1, pero empleando las células de *Bacillus subtilis ssp níger*.

La conversión obtenida fue de un 68% al cabo de 3 hrs de reacción, con una productividad de 28×10^{-5} mM/(hr x 10^6 cel).

Ejemplo 8

50 *Síntesis de 2',3'-dideoxiribunucleosido de purina a partir de 2',3'-dideoxiuridina empleando células de Bacillus subtilis ssp níger CECT 4071*

55 La síntesis se realizó en las condiciones descritas para el ejemplo 1, pero empleando las células de *Bacillus subtilis ssp níger*.

La conversión obtenida fue de un 38% al cabo de 21 hrs de reacción, con una productividad de 1.2×10^{-5} mM/(hr x 10^6 cel).

60 Ejemplo 9

Síntesis del ribonucleósido del 3-carboxamido-1,2,4-triazol a partir de uridina empleando células de Bacillus subtilis ssp níger CECT 4071

65 La síntesis se realizó en las condiciones descritas para el ejemplo 1, pero empleando las células de *Bacillus subtilis ssp níger*.

ES 2 241 487 B2

La conversión obtenida fue de un 45% al cabo de 3 hrs de reacción, con una productividad de 12×10^{-5} mM/(hr x 10^6 cel).

Ejemplo 10

5

Síntesis del ribonucleósido de 6-mercaptopurina a partir de uridina empleando células de Bacillus subtilis ssp níger CECT 4071

10 La síntesis se realizó en las condiciones descritas para el ejemplo 1, pero empleando las células de *Bacillus subtilis ssp níger*.

La conversión obtenida fue de un 36% al cabo de 3 hrs de reacción, con una productividad de 7×10^{-5} mM/(hr x 10^6 cel).

15 Ejemplo 11

Síntesis del 2'-deoxiribonucleósido de 6-mercaptopurina a partir de 2'-deoxiuridina empleando células de Bacillus subtilis ssp níger CECT 4071

20 La síntesis se realizó en las condiciones descritas para el ejemplo 1, pero empleando las células de *Bacillus subtilis ssp níger*.

La conversión obtenida fue de un 18% al cabo de 3 hrs de reacción, con una productividad de 5×10^{-5} mM/(hr x 10^6 cel).

25

Ejemplo 12

Síntesis de 2'-deoxiribonucleósido de 5'-fluoruracilo a partir de 2'-deoxiuridina empleando células de Bacillus psychrosaccharolyticus CECT 4074

30

La síntesis se realizó en las condiciones descritas para el ejemplo 1, pero empleando las células de *Bacillus psychrosaccharolyticus*.

35 La conversión obtenida fue de un 5% al cabo de 1 hr de reacción, con una productividad de $3,2 \times 10^{-5}$ mM/(hr x 10^6 cel).

Ejemplo 13

40 *Síntesis de Z-deoxiribonucleósido de 5'-clorouracilo a partir de 2'-deoxiuridina empleando células de Bacillus psychrosaccharolyticus CECT 4074*

La síntesis se realizó en las condiciones descritas para el ejemplo 1, pero empleando las células de *Bacillus psychrosaccharolyticus*.

45 La conversión obtenida fue de un 10% al cabo de 3 hrs de reacción, con una productividad de 7×10^{-5} mM/(hr x 10^6 cel).

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos en un único paso por intercambio de bases que comprende:

- 5 a) un nucleósido de uracilo como producto de partida
- b) un microorganismo psicotolerante o psicotrofo productor de nucleósido fosforilasas o 2'-desoxirribosil-transferasas como agente catalizador
- 10 c) una temperatura de reacción entre 45 y 60°C con una escasa formación de hipoxantina como producto secundario de la reacción por descomposición de nucleósidos de 6-aminopurina.

2. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la temperatura de reacción es de 57°C.

3. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se emplean las células enteras de los microorganismos utilizados.

20 4. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se parte de 2'-deoxiuridina y se obtiene 2'-deoxiadenosina utilizando cepas de *Bacillus psychrosaccharolyticus*.

5. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se parte de 2'-deoxiuridina y se obtiene 2'-deoxiadenosina utilizando cepas de *Psychrobacter immobilis*.

25 6. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se parte de 2'-deoxiuridina y se obtiene 2'-deoxiadenosina utilizando cepas de *Bacillus subtilis ssp niger*.

7. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se parte de uridina y se obtiene adenosina utilizando cepas de *Photobacterium phosphoreum*.

8. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se parte de uridina y se obtiene adenosina utilizando cepas de *Photobacterium leiognathi*.

35 9. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se parte de 2'-deoxiuridina y se obtiene 2'-deoxiadenosina utilizando cepas de *Photobacterium leiognathi*.

10. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se parte de 2',3'-dideoxiuridina y se obtiene 2',3'-dideoxiadenosina utilizando cepas de *Bacillus subtilis ssp niger*.

40 11. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se parte de 2',3'-dideoxiuridina y se obtiene 2',3'-dideoxiribonucleósido de purina utilizando cepas de *Bacillus subtilis ssp niger*.

45 12. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se parte de uridina y se obtiene ribonucleósido de 3-carboxamido-1,2,4-triazol utilizando cepas de *Bacillus subtilis ssp niger*.

13. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se parte de uridina y se obtiene ribonucleósido de 6-mercaptopurina utilizando cepas de *Bacillus subtilis ssp niger*.

50 14. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se parte de 2'-deoxiuridina y se obtiene 2'-deoxiribonucleósido de 6-mercaptopurina utilizando cepas de *Bacillus subtilis ssp niger*.

55 15. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se parte de 2'-deoxiuridina y se obtiene 2'-deoxiribonucleósido de 5'-fluoruracilo utilizando cepas de *Bacillus psychrosaccharolyticus*.

60 16. Procedimiento para la síntesis de nucleósidos, según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se parte de 2'-deoxiuridina y se obtiene 2'-deoxiribonucleósido de 5'-clorouracilo utilizando cepas de *Bacillus psychrosaccharolyticus*.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 241 487

② N° de solicitud: 200400817

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.04.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12P 19/38, 19/40, 19/28

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 4614719 A (FUJISHIMA et al.) 30.09.1986, todo el documento.	
A	US 4458016 A (YAMANAKA et al.) 03.07.1984, todo el documento.	
A	TRELLES, J.A. et al. Purine nucleoside synthesis from uridine using immobilised <i>Enterobacter gergoviae</i> CECT 875 whole cells. <i>Tetrahedron Letters</i> , 2003, Vol. 44 (12), páginas 2605-2609.	
A	LEWKOWICZ, E.S. et al. An improved microbial synthesis of purine nucleosides. <i>Biotechnology Letters</i> , 2000, Vol. 22, páginas 1277-1280.	
A	CAVICCHIOLI, R. et al. Low-temperature extremophiles and their applications. <i>Current Opinion in Biotechnology</i> , 2002, Vol. 13 (3), páginas 253-261.	
A	RAMANA, K.V. et al. Biotechnological application of psychrophiles and their habitat to low-temperature. <i>Journal of Scientific and Industrial Research</i> , 2000, Vol. 59, páginas 87-101.	
A	RUSSEL, N.J. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. <i>Extremophiles</i> , 2000, Vol. 4, páginas 83-90.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 12.08.2005	Examinador A. Polo Díez	Página 1/1
---	-----------------------------------	----------------------