

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 733**

51 Int. Cl.:

A61K 31/675 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2005 E 05726279 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 1664317**

54 Título: **Uso de precursor Z para la fabricación de un agente para el tratamiento de deficiencia del cofactor de molibdeno humano**

30 Prioridad:

29.01.2004 DE 102004004642

30.01.2004 DE 102004063948

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

07.06.2013

73 Titular/es:

**ALEXION PHARMA INTERNATIONAL SARL
(100.0%)**

**Avenue du Tribunal Fédéral 34
1005 Lausanne , CH**

72 Inventor/es:

**SCHWARZ, GUENTER;
MENDEL, RALF;
SANTAMARIA, JOSÉ y
REISS, JOCHEN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 406 733 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

Uso de precursor Z para la fabricación de un agente para el tratamiento de deficiencia del cofactor de molibdeno humano

5 La invención se refiere al uso de precursor Z para la fabricación de un agente para el tratamiento de deficiencia del cofactor de molibdeno humano que se atribuye directa o indirectamente a una síntesis del cofactor de molibdeno alterada.

10 El cofactor de molibdeno (Moco), un compuesto de pterina coordinado con molibdeno (Mo) altamente conservado, es necesario para la actividad de todas las enzimas de molibdeno con excepción de nitrogenasa. El Moco se prepara mediante una ruta de síntesis de varias etapas, única y evolutivamente antigua, de la que hasta la fecha se han identificado dos intermedios: el derivado de pterina exento de azufre y metal precursor Z y la molibdopterina (MPT), una pterina con una función eno-ditilo que es esencial para la unión a Mo. Este último componente de pterina forma, presumiblemente, una pironapterina similar al Moco, que se ha encontrado en estructuras cristalinas de enzimas de Mo. La MPT también se coordina con wolframio (W) en enzimas dependientes de W.

15 A partir de HAENZELMANN PETRA Y COL.: "Functionality of alternative splice forms of the first enzymes involved in human molybdenum cofactor biosynthesis" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, volumen 277, Nº 21, 24 de mayo de 2002 (24-05-2002), páginas 18303-18312, ISSN: 0021-9258, se sabe que la expresión recombinante de ambas "proteínas que sintetizan el precursor Z" MOCS1A y MOCS1B (homólogas de las proteínas bacterianas MoaA y MoaC) tiene como consecuencia la acumulación de precursor Z.

20 Se sabe, además, que el precursor Z solo puede verificarse en las cepas de E. coli que presentan un defecto en la transformación de precursor Z a molibdopterina precursor Z, en este caso específicamente: una MPT-sintasa inactiva, que cataliza la etapa de transformación indicada.

25 Además, se conoce por WUEBBENS MARGOT M Y COL.: "Structural characterization of a molybdopterin precursor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, volumen 268, Nº 18, 1993, páginas 13493-13498, ISSN: 0021-9258, la purificación de precursor Z a partir de células chIN de E. coli deficientes en molibdopterina mediante extracción ácida, una columna de intercambio aniónico de HPLC y una columna de fase inversa/ intercambio aniónico, habiéndose cultivado las células E. coli a 37 °C y sin inductor.

Los tratamientos sustitutivos para enfermedades hereditarias, incluidos procedimientos para reemplazar enzimas, están limitados a menudo por la disponibilidad limitada del principio activo terapéutico necesario.

30 La deficiencia del cofactor de molibdeno (Moco) es una disfunción genética pleiotrópica que se caracteriza por la disminución de enzimas dependientes de molibdeno sulfito-oxidasa, xantina-oxidoreductasa y aldehído-oxidasa debida a mutaciones en genes de biosíntesis de Moco. Un intermedio de esta ruta de biosíntesis, el "precursor Z", es más estable que el mismo cofactor y posee una estructura conservada en todos los reinos de organismos. Por este motivo, la sustancia se produjo en la bacteria E. coli, se purificó y se usó para el tratamiento de ratones con genes inactivados ("knock-out") deficientes en precursor Z que se corresponden en su cuadro clínico con la deficiencia del cofactor humano. Los ratones tratados con precursor Z alcanzan el estado adulto y son capaces de reproducirse. 35 Análisis bioquímicos y morfológicos, así como investigaciones sobre el comportamiento, sugieren que el tratamiento descrito es adecuado para atenuar la mayor parte de los síntomas de la deficiencia de Moco humano.

40 Todas las enzimas que contienen molibdeno (Mo) de seres humanos, animales, vegetales, arqueas y bacterias, con la única excepción de nitrogenasa procariótica, necesitan un cofactor que está compuesto por un esqueleto orgánico, la denominada molibdopterina (MPT) y molibdeno^{B1}. Este cofactor de molibdeno (Moco) único y "universal" posee en todos los grupos filogenéticos la misma estructura básica y en forma libre es muy inestable, en particular en condiciones aerobias, a no ser que esté unido a una apoproteína^{B2}. La ruta de biosíntesis de varias etapas, mediante la que un derivado de guanosina se transforma en Moco activo, está conservada evolutivamente^{B1} y las proteínas correspondientes de diversos organismos implicadas en la síntesis de Moco son extremadamente 45 homólogas^{B3-B7}. Un defecto debido a una mutación en la biosíntesis de Moco provoca una reducción simultánea de la actividad de todas las enzimas de Mo, incluida la sulfito-oxidasa^{B8,B9}. La deficiencia de Moco humana es un trastorno grave, genético, autosómico recesivo que clínicamente no puede diferenciarse de la deficiencia de sulfito-oxidasa, menos frecuente^{B10-B12}. Aunque se conocen pocos casos graves^{B13}, la mayor parte de los pacientes afectados presentan anomalías neuronales tales como ataques no tratables y desarrollo deficiente del cerebro, lo que es atribuible a la toxicidad del sulfito, una falta de sulfato o a ambas. Hasta la fecha, no hay ningún 50 tratamiento eficaz disponible, por lo que los pacientes afectados mueren generalmente en la primera infancia^{B14}.

Los primeros genes eucarióticos de la biosíntesis de Moco que se pudieron aislar, procedían de la planta *Arabidopsis thaliana*^{B15}. Una búsqueda de secuencias homólogas condujo a la identificación del primer gen humano de la biosíntesis de Moco, MOCS1^{B3}. Los productos génicos MOCS1A y MOCS1B, cuya expresión implica un patrón 55 complicado de ajustes alternativos^{B16-B18}, transforman un derivado de guanosina en el precursor Z exento de azufre, que ya dispone de la única cadena lateral de MPT compuesta por cuatro átomos de carbono^{B19}. Las mutaciones en el gen MOCS1 se detectaron en dos tercios de los pacientes deficientes en Moco, que representan el grupo de complementación A o el tipo A deficiencia en Moco^{B10, B20}. En una etapa posterior, el precursor Z se transforma en

MPT; esto tiene lugar por medio de un enzima que está codificada por el gen *MOCS2* y es activada por el producto génico *MOCS3*^{B4}. La mayor parte de los pacientes de tipo B presentan mutaciones *MOCS2*^{B12,B13,B21}. Finalmente, se transfiere Mo por medio de la proteína multifuncional gefirina a MPT^{B5}. Hasta la fecha se ha descrito solo una familia con mutaciones en el gen de *gefirina* (*GEPH*) que provoca una deficiencia de Moco (tipo C)^{B22}.

- 5 Como consecuencia de mutaciones en diversas etapas de la biosíntesis de Moco se ha descubierto que los fibroblastos de pacientes de tipo B presentan una concentración superior a la normal de precursor Z y lo suministran al medio de cultivo; este puede ser absorbido por células de tipo A en el transcurso de un cocultivo, lo que conduce al restablecimiento de la actividad de enzimas de Mo *in vivo*^{B20}. Además, pudo demostrarse que el precursor Z procedente de fibroblastos humanos es idéntico al precursor bacteriano^{B23,B24} debido a que su biosíntesis se realiza de forma conservada en todos los organismos^{B15-B17}.

Un objetivo de la invención es proporcionar un agente para el tratamiento de la deficiencia de cofactor de molibdeno humano que puede deberse directa o indirectamente a una síntesis del cofactor de molibdeno alterada.

Este objetivo se logra con respecto al concepto general de la reivindicación 1 usando como componente esencial de este agente el precursor Z.

- 15 Con ello es posible, en primer lugar, preparar un agente para el tratamiento de la deficiencia de cofactor de molibdeno humano que puede deberse directa o indirectamente a una síntesis del cofactor de molibdeno alterada.

Se describe la obtención de un intermedio de pterina a partir de bacterias que se ha usado exitosamente en el tratamiento de una enfermedad mortal e incurable hasta la fecha.

- 20 El precursor Z presenta la fórmula molecular $C_{10}H_{14}N_5O_8P$ y representa una piranopterina y posee un diol geminal en la cadena lateral.

El precursor Z con la fórmula molecular $C_{10}H_{14}N_5O_8P$ que representa una piranopterina tiene el diol geminal en la posición C1'.

Otros detalles de la invención se obtienen a partir de la descripción presentada a continuación y de las figuras adjuntas, en las que se ilustran las formas de realización preferentes de la invención.

- 25 En las figuras se muestra:

Figura 1: Esquema general de la biosíntesis de Moco. Se muestran las estructuras de Moco (tal como se encontraron en la estructura cristalina de enzimas de Mo) y del producto de oxidación del precursor Z, el compuesto Z (14,15). La numeración se representa y se usa tal como en los esquemas de numeración de pterina estándar; para discusión, véase (12).

- 30 Figura 2: ESI-EM del precursor Z. A, espectro EM del precursor Z purificado y coordinación estructural de los iones moleculares esenciales. B, espectro EM/EM del pico principal a 364 Da que se muestra en (A) y coordinación estructural de los iones del fragmento principal. Los espectros se registraron en un modo de iones positivos. Por lo tanto, todos los iones de moleculares o de fragmentos se muestran como moléculas neutras y no en modo $[M+H]^+$ como en los espectros.

- 35 Figura 3: espectroscopia de RMN de 1H y de correlación a 300 K del precursor Z (A), de precursor Z oxidado parcialmente (B) y de su producto de oxidación estable, el compuesto Z (C). A-C, El espectro de RMN de 1H del precursor Z se registró con una muestra de 150 μg , disuelta en 700 μl de D_2O y acidificada a pH 1 mediante la adición de 2 μl de DCI al 36 %. Las mediciones se repitieron después de una oxidación parcial (14 horas, B) y total (14 días, C). Se representan las regiones relevantes de los tres espectros. Nota: unas señales de doblete de tripletes de H_b' en el compuesto Z se encuentran por debajo de la señal de fondo de agua a 300 K, pero es claramente visible a 315 K (compárese 5,0 - 5,1 ppm en C). D, espectro de RMN de 1H de 2D-COSY de la muestra de precursor Z parcialmente oxidado a partir de (B). E, estructura del precursor Z tal como se determina por espectroscopia ESI-EM y de RMN de 1H , así como mediante la estructura del producto de oxidación compuesto Z. La denominación de los protones es la misma que en A (precursor Z) y C (compuesto Z), así como en la tabla 1 y en el texto. Los protones del compuesto Z están marcados con una raya para diferenciarlos de los del precursor Z.

Figura 4: Purificación HPLC de precursor Z procedente de células MJ7 ch1M (DE3)37 de *E. coli* que contienen pPH15moaA y pPHLysmoaC. (a) Perfil de elución de una columna C8 preparativa. (b) Perfil de elución de una columna SAX. (c) Perfil de elución de una columna C8 analítica. Para más detalle véanse los procedimientos.

- 50 Figura 5: El precursor Z purificado es estable en condiciones fisiológicas. (a) Oxidación del precursor Z para dar el compuesto Z. (b) espectros de absorción UV-VIS de precursor Z 22 μM después de una incubación de 17 h a temperatura ambiente en 2x tampón PBS (pH 6,9). Los espectros se registraron en intervalos temporales después de dilución en tampón tal como se indica. (c) Análisis cinético de la oxidación del precursor Z mediante registro de la absorción a 350 nm a partir de los espectros mostrados en (b).

Figura 6: Restablecimiento de la biosíntesis de MPT *in vitro* e *in vivo*. (a) Restablecimiento *in vitro* de extractos de

hígado deficientes en *MOCS1* con precursor Z. Se incubó (1 h) extracto bruto de proteína de un ratón *MOCS1*^{-/-} de cinco días de edad con las cantidades indicadas de precursor Z purificado por mg de proteína. El restablecimiento de la síntesis de MPT se midió mediante el ensayo de reconstitución *nit-1*. (b-d) Análisis bioquímico de animales deficientes en *MOCS1* tratados con precursor Z. Se inyectó a los ratones dos veces por semana cantidades crecientes de precursor Z, comenzando con 2 µg después del nacimiento hasta 8 µg después del destete. Entre los días 25-55 después del nacimiento se suspendió el tratamiento. Los días 0 (4 horas después de la última inyección), 1, 4 y 7 se sacrificaron en cada caso dos ratones. Se extrajeron dos muestras de hígado de cada ratón y se procesaron posteriormente por separado. Cada valor de la figura se determinó de este modo cuatro veces. La MPT total, incluido Moco (b), actividad de sulfito-oxidasa (c) y xantina-deshidrogenasa (d) se indican como porcentaje del valor de tipo silvestre correspondiente (n=4).

Figura 7: Capacidad de aprendizaje de ratones deficientes en *MOCS1* tratados con precursor Z en un laberinto acuático. Los valores representan un promedio de seis ratones silvestres (wt, barras negras) y seis ratones deficientes en *MOCS1* tratados con precursor Z (*MOCS1*^{-/-}, barras blancas). Las barras muestran el tiempo hasta alcanzar la plataforma en el primer ensayo de la primera pasada (A1), los tres ensayos restantes de la primera pasada (A2-4), el primer ensayo de la segunda pasada (B1) y finalmente los tres ensayos siguientes de la segunda pasada (B2-4). C, tiempo (de un total de 120 segundos) que se ha consumido en el sector correcto (sin plataforma) con respecto a las pasadas A y B.

Figura 8: Comparación morfológica de secciones de riñones (a,b) y cerebro (c,d) de ratones de tipo silvestre (a,c) y ratones deficientes en *MOCS1* tratados con precursor Z (b,d). El tratamiento se realizó con 2-4 µg cada tres días. (a) Riñones regulares con glomérulos normales (flecha), túmulos desarrollados característicamente e intersticios estrechos (200x). (b) En el caso de ratones deficientes en *MOCS1* tratados los riñones contenían numerosas piedras en los túbulos (†) con epitelios atrofiados y formación de células gigantes polinucleares (□). Se expandieron los túbulos proximales (28 +/- 19 %). Los intersticios presentaron un aumento de la matriz (13 +/- 13 %) y una infiltración no específica con células mononucleares. El glomérulo es normal (flecha). (c,d) Sección del cerebro coronal (Cx, córtex; Hi, hipocampo; Str, estriato; Th, tálamo; Hy, hipotálamo) correspondiente de ratones de tipo silvestre (c) y ratones *MOCS1*^{-/-} tratados con precursor Z (d).

Caracterización espectroscópica y resolución estructural del precursor Z purificado

La espectrometría de ionización por electropulverización-masas (ESI-EM) de alta resolución requirió de un ion $[M+H]^+$ que fuera compatible con la fórmula molecular $C_{10}H_{15}N_5O_8P$. Después, la espectroscopia de RMN de ¹H permitió no solo la caracterización estructural de la molécula, sino que también confirmó que este intermedio está sometido a oxidación directa para dar el producto secuencial no productivo bien caracterizado ya anteriormente, el compuesto Z. Los desplazamientos químicos ¹H y los datos de constantes de acoplamiento difieren de modelos estructurales anteriores e indican que el precursor Z ya existe como sistema de piranopterina, así como que posee una función diol dual en la posición C1'.

El cofactor de molibdeno (Moco) es parte del centro activo de todas las enzimas dependientes de Mo (1), con la excepción de la nitrogenasa, y tiene un papel importante en los ciclos generales del carbono, el azufre y el nitrógeno (2). Las enzimas de Mo son importantes para diversos procesos metabólicos tales como, por ejemplo, desintoxicación de azufre y catabolismo de purina en mamíferos (3), así como asimilación de nitrógeno y síntesis de fitohormonas en plantas (4). El Moco está constituido por una parte orgánica, que inicialmente se denominó molibdopterina (5), una piranopterina con un grupo fosfato terminal, así como por un átomo de molibdeno, que está unido mediante un sistema eno-ditiol (6) (Fig. 1). En todos los organismos investigados hasta la fecha, el Moco se produce mediante una ruta de síntesis antigua y altamente conservada (7). En seres humanos, una mutación en cualquier etapa de la biosíntesis de Moco en pleiotropos tuvo como consecuencia una pérdida de actividad de sulfito-oxidasa, aldehído-oxidasa y xantino-oxidoreductasa (8,9). Los pacientes afectados presentan anomalías neurológicas y mueren en la infancia temprana, debido a que, hasta la fecha, no existe ninguna terapia (10). Adicionalmente, muchos procariotas, principalmente arqueas, contienen enzimas metálicas similares al cofactor de piranopterina-eno-ditiolato, que en lugar de con Mo están coordinadas con W. Por lo tanto, el componente de piranopterina básico de enzimas de Mo y W se abrevia como MPT, que representa MolibdoPTerina o Piranopterina-diTiol unido a Metal (11,12). Se presume también que la biosíntesis del cofactor de W es similar a la biosíntesis de Moco, con la excepción de la etapa final de la inserción del metal (7).

La biosíntesis de Moco (Fig. 1) puede subdividirse en tres etapas (7,13). En primer lugar se sintetiza el precursor Z exento de azufre a partir de un derivado de guanosina mediante la acción de dos proteínas (14, 15). En la segunda etapa se transforma el precursor Z mediante la introducción de dos átomos de azufre en las posiciones C1' y C2' en MPT (véase la numeración nueva de la Fig. 1), formándose una función eno-tiol (16). Esta reacción se cataliza mediante la MPT-sintasa heterotetrámera (17), que transfiere dos átomos de azufre de dos subunidades pequeñas tiocarboxiladas a los átomos de carbono C1' y C2' (18,19). En la última etapa de la biosíntesis de Moco se transfiere un átomo de Mo a uno (procariotas y eucariotas) o a dos grupos MPT-ditiol (procariotas), lo que tiene como consecuencia la formación de Moco (20, 21). En bacterias se observa una modificación adicional del fosfato de pterina mediante el acoplamiento de un nucleótido (22). La estructura química básica del Moco se resolvió mediante la investigación pionera de Rajagopalan y colaboradores (13, 23). Su última descripción del Moco se resolvió mediante las estructuras cristalinas de enzimas que contienen Mo (24) y W (25), en las que se descubrió un anillo de

pirano adicional no previsto que se forma entre el grupo hidroxilo del átomo C3' y la posición C7 de la pterina (Fig. 1). En base a esta observación se presumió que el anillo de pirano o bien está ya presente en el intermedio (12, 18, 26) o bien se forma durante la inserción en la apoenzima (27). Hasta la fecha no se ha investigado ni la MPT ni el precursor Z por medio de espectroscopia de RMN de ^1H o de ^{13}C , ni se ha cristalizado. Por lo tanto, persiste la cuestión de si la cadena lateral de pterina forma ya en una etapa anterior de la biosíntesis de Moco una estructura de piranopterina o no.

El modelo de estructura del precursor Z se ha basado en la estructura del producto de oxidación (28), en espectroscopia de RMN de ^{31}P , en espectroscopia de masas (EM), así como en estudios de oxidación (14). La conversión estequiométrica directa de precursor Z mediante una oxidación de dos electrones en el producto de oxidación estable compuesto Z implicó un estado dihidro del precursor Z que se explicó mediante una estructura quinonoide y una función enol en C1' que pudo someterse a una tautomerización ceto-enólica (14). El precursor Z está también, como el compuesto Z, exento de azufre, y contiene un fosfato cíclico, que une C2' y C4'. En comparación con MPT y Moco, el precursor Z es el intermedio estable con una semivida estimada de varias horas a valores de pH bajos (14).

Por lo tanto, hemos establecido un procedimiento para la purificación de grandes cantidades de precursor Z a partir de *E. coli*. Informamos de un análisis espectroscópico detallado y la caracterización estructural del precursor Z. Por medio de procedimientos de RMN de ^1H y de EM mostramos que el precursor Z ya posee una estructura de piranopterina totalmente reducida y está hidratado principalmente en la posición C1', lo que produce un diol dual.

Productos químicos

NaCl, levadura, triptona e isopropiltiogalactósido se obtuvieron de Duchefa Biochemie, acetato de amonio de Merck, monohidrato de ácido cítrico y dihidrato de citrato de sodio de Baker, ácido fórmico de Sigma, D_2O y DCI se obtuvieron de Deuteo GmbH y NaOD de Fluka AG.

Construcción del plásmido para la coexpresión de MoaA y MoaC

Se clonaron *moaA* y *moaC* de *E. coli* mediante PCR a partir de pJR11 (29). La secuencia génica publicada (30) se usó para la producción de oligonucleótidos que posibilitaban la clonación en los sitios de escisión *Nde I* y *Xho I* de la región de clonación del vector de expresión pET15b (Novagen). Los plásmidos producidos se denominaron pPH15*moaA* y pPH15*moaC*. La unidad de expresión de *moaC* completa, incluidos el elemento promotor y operador de T7 regulado por IPTG y el sitio de unión a ribosomas sintético de pPH15*moaC*, se subclonó en los sitios de escisión *Sph I* y *Hind III* de pLysS (Novagen), produciéndose a partir de ello el pPHLys*moaC*.

Aislamiento y purificación del precursor Z

El precursor Z se purificó a partir de *E. coli* mediante un protocolo modificado, que ya se ha descrito (14). Se cultivaron células MJ7 c1M (DE3) (31), que contenían los plásmidos pPH15*moaA* y pPHLys*moaC*, anaerobiamente a 20 °C en medio LB con 120 µg/ml de ampicilina, 30 µg/ml de cloranfenicol e IPTG 50 µM y se cosecharon por centrifugación (5 min, 12000 g, 4 °C). Antes de la purificación por HPLC se resuspendieron las células en dos volúmenes de HCl 0,4 M, se sometieron a sonicación y se centrifugaron. Para determinar posibles modificaciones que pudieran producirse mediante la acidificación de las células, se extrajeron las células en un experimento controlado en tampón de acetato 100 mM (pH 3,0). El sobrenadante transparente se alimentó a una columna de "fase inversa" preparativa (C8, 5 µm, 250*10 mm, Kromasil, EKA Chemicals) que se había equilibrado en acetato de amonio 5 mM, pH 5,0. El precursor Z eluyó en el primer máximo de absorción y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. En la segunda etapa se purificaron las fracciones que contenían el precursor Z y se alimentaron a una columna SAX semipreparativa (15 µm, 250 x 10 mm, esfera de adsorción, Alltech), que se había equilibrado en tampón de citrato 10 mM, pH 3,0. El precursor Z se eluyó isocráticamente después de aproximadamente 30 ml y se congeló en nitrógeno líquido. Se logró una purificación final mediante la alimentación de precursor Z a una columna analítica de "fase inversa" (C18, 5 µm, 250 x 4 mm, Alltech), equilibrada en ácido fórmico 10 mM. Las fracciones que contienen precursor Z se purificaron, se congelaron en partes alícuotas de 20 µl en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior. Las concentraciones de precursor Z se determinaron mediante el coeficiente de extinción $\epsilon_{267\text{nm}} = 8960 \text{ M cm}^{-1}$ (14).

Espectroscopia de masas por electropulverización

El precursor Z se disolvió en una mezcla 1:1 (vol:vol) de metanol / ácido fórmico al 1 %. Aproximadamente 3 µl de esta solución (concentración final: aproximadamente 20 pmol/µl) se alimentaron a un capilar de nanopulverización recubierto con oro (Protana). La punta del capilar se dispuso verticalmente frente a la abertura de entrada de un espectrómetro de masas "cuadropolo-tiempo de vuelo" (QTOF 2) (Micromass) que estaba equipado con una fuente de iones de nanopulverización y se aplicó una tensión de aproximadamente 1000 V. Para experimentos de disociación inducidos por colisión se transmitieron selectivamente iones precursores de un analizador de masas cuadrupolo a la celda de colisión. Como gas de colisión se usó argón y la energía cinética se ajustó a aproximadamente -25 eV. Los iones producto resultantes se separaron a continuación mediante un analizador de masas "tiempo de vuelo" ortogonal. La composición isotópica de la muestra se determinó en modo de masas preciso, que usa reserpina ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 609,2811 \text{ Da}$) como molécula de referencia interna.

Espectroscopia de RMN de ^1H

Los espectros de correlación de RMN de ^1H monodimensionales (1D) y bidimensionales (2D) (COSY) se registraron a 300 K con un espectrómetro de RMN Bruker Avance DMX600 que está unido a la resonancia preponderante de deuterio del disolvente D_2O . Los desplazamientos químicos se indican en ppm con relación a la señal de fondo del disolvente (4,80 ppm) y los acoplamientos en Hz. Las muestras (100-200 μg) que contienen precursor Z se liofilizaron y se resuspendieron en 700 μl de D_2O desgasificado y 2 μl de DCl al 36 %. Para evitar la oxidación se gasificó el tubo durante 5 min con gas nitrógeno. Estas soluciones fueron lo suficientemente estables para registrar los espectros tanto de 1D como también de COSY-2D. La exposición posterior de la solución al aire provocó la oxidación del precursor Z para dar el producto único principal bien descrito, el compuesto Z, y se realizó un seguimiento de esta reacción en intervalos regulares durante el registro de los espectros 1D de ^1H . En condiciones normales, esta reacción se finaliza después de 14 días en D_2O y DCl.

Resultados

Aislamiento y purificación del precursor Z

El precursor Z se aisló a partir de *E. coli* y se purificó en un procedimiento de cromatografía HPLC de tres etapas, con lo que se obtuvo un producto homogéneo, que se verificó mediante espectroscopia UV-vis (no se muestran datos), ESI-EM y RMN de ^1H (véase más adelante). En promedio, se obtuvo un rendimiento de 40 μg de precursor Z por litro de cultivo de *E. coli*. La molécula aislada era idéntica a preparaciones anteriores (12), debido a que presentó el mismo espectro de absorción UV-vis con un máximo de absorción a 267 nm a pH 3,0 y después de la exposición al aire se obtuvo como resultado el mismo producto de oxidación inequívocamente caracterizado, el compuesto Z.

ESI-EM de precursor Z

Se usó ESI-EM para determinar la masa molecular del precursor Z. En modo de ion positivo el ESI-EM produjo un ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ a 364 Da (Fig. 2A), que era 18 Da superior a la masa esperada de 346 Da de la estructura del modelo anterior (14). Realmente, no había ninguna indicación de dicho pico en el espectro. Otro pico pequeño del espectro (Fig. 2A) a 344 Da correspondió a la masa esperada para el compuesto Z (14), que en dichas pruebas está inevitablemente presente debido a una oxidación parcial (Fig. 2A). Este hecho se confirmó también mediante análisis de RMN de ^1H (véase más adelante). Al contrario que en ensayos anteriores con termopulverización o "ionización por bombardeo con átomos rápidos" pudimos determinar en modo de ion positivo mediante ESI-EM con $364,064 \pm 0,003$ Da ($364,0658$ Da calculados para $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$) una masa exacta para el precursor Z. Por consiguiente, la fórmula molecular del precursor Z $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$ no coincidía con la fórmula postulada anteriormente $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}$ (12). La nueva fórmula del pico de 364 Da permite presumir una hidratación del precursor Z, que lo más probable es que tenga lugar en la posición C1', para la que ya se ha propuesto una función de hidroxilación única con una posible tautomerización ceto-enólica (14). La hidratación adicional en C1' tendría como consecuencia la formación de un diol dual (Fig. 2A). Una EM/EM del pico de 364 Da mostró un fragmento principal a 166 Da (Fig. 2B), que corresponde a una dihidropterina semioxidada e indica la naturaleza de pterina del pico. La dihidropterina puede formarse fácilmente después de la apertura del anillo de pirano sin oxidación adicional (compárese con Moco en la Fig. 1). Se observaron dos picos más a 121 Da y 199 Da, que corresponden respectivamente a las masas de la cadena lateral sin o con el fosfato cíclico. Ambas masas solo se correlacionan con fragmentos de cadenas laterales hidratados que poseen un diol dual en la posición C1'. Además, la EM/EM del pico de 344 Da proporcionó en la muestra posterior o en la muestra de compuesto Z purificado un espectro de iones producto similar a un fragmento dominante a 164 Da (no se muestran datos), que corresponde a una pterina no sustituida totalmente oxidada que es comparable con datos de EM/EM de otras pterinas hidrogenadas (32).

Espectroscopia de RMN de ^1H de precursor Z

Para resolver la estructura del precursor Z y para confirmar nuestra hipótesis de la hidratación que se ha observado en la EM, registramos espectros de RMN de ^1H en D_2O acidificado y se realizó un seguimiento de la variación de las posiciones y las intensidades de señales durante la oxidación para dar el compuesto Z (Fig. 3A-D). En base a los desplazamientos químicos de ^1H (Fig. 3A-C), a los compuestos de los espectros COSY 2D (Fig. 3D) y a las magnitudes de las constantes de acoplamiento, se asignaron inequívocamente todas las señales esperadas (seis protones, H_a - H_f) (Tab. 1). Los desplazamientos químicos de ^1H y las constantes de acoplamiento (^1H - ^1H y ^1H - ^{31}P - ^1H) del producto de oxidación compuesto Z fueron comparables con los datos publicados (15, 28) y se identificaron estos sin duda como compuesto Z (Fig. 3C). Las tres señales de RMN de ^1H de los protones H_a , H_b y H_c del precursor Z son, con respecto a los desplazamientos químicos, así como a las señales de acoplamiento ^1H - ^1H y ^1H - ^{31}P (Fig. 3 y Tab. 1), comparables con los protones que están presentes en el espectro del compuesto Z (H_a' , H_b' y H_c'). Estos tres protones se asignaron a C4' (H_a y H_b) y C3' (H_c) y la magnitud del acoplamiento ^1H - ^{31}P adyacente de los protones C4' (22,7 o 2,1 Hz) indicaron el fosfato cíclico intacto (12). El desplazamiento mayor de H_c entre estos tres protones indica variaciones significativas en el entorno de C3' que pueden explicarse mediante la apertura de la estructura de anillo de piranopterina propuesta para el precursor Z durante la oxidación para dar el compuesto Z.

Las señales de los tres protones restantes (H_d , H_e y H_f) de precursor Z se desvían de forma significativa de las del compuesto Z (H_d' , H_e' y H_f' , Fig. 3 y Tab. 1). El precursor Z muestra un doblete de 1,7 Hz a 5,39 ppm (H_f) que se

correlaciona con un doblete ancho (señal ancha) a 3,62 ppm (H_e). Estas dos señales se pierden lentamente durante la conversión para dar el compuesto Z, mientras que simultáneamente aparece la señal a 9,39 ppm (H_f , Fig. 3A-C). El desplazamiento químico de las señales H_f y H_e es comparable con las piranopteridinas poco sintetizadas químicamente (33). Independientemente de los datos de ESI-EM altamente resueltos, las constantes de acoplamiento y una gran diferencia en los desplazamientos químicos de estos dos protones no coinciden con el modelo de estructura anterior, debido a que habrían pertenecido a un grupo metilo sustituido con nitrógeno. La tercera señal importante muestra acoplamientos adyacentes similares a H_c y P, tanto en el precursor Z como también en el compuesto Z, pero se desplazan durante el proceso de oxidación hacia abajo de 4,415 ppm a 6,32 ppm (Fig. 3 y Tab. 1). Estos datos implican la misma disposición relativa de H_d con respecto a H_c y P en ambos compuestos. La diferencia de 1,87 ppm en el desplazamiento químico de la señal de H_d favorece mucho un cambio significativo en sustituyentes de C1' entre el precursor Z y el compuesto Z, excluyendo la posibilidad de una función cetó no modificada en ambos componentes. Los espectros de RMN de 1H adicionales se registraron a distintos valores de pH (1, 3, 7 y 10) sin observar una variación significativa en las señales de protones de precursor Z (no se muestran datos). La única diferencia destacable a valores de pH altos fue el ensanchamiento de las señales de H_e y H_f que se atribuye a una oxidación rápida para dar el compuesto Z. Por lo tanto, los datos de ESI-EM y RMN de 1H altamente resueltos para el precursor Z junto con las variaciones observadas en la oxidación para dar el compuesto, solo son compatibles con la estructura de piranopterina cerrada y un diol dual en C1' (Fig. 4E).

Tabla 1: Señales de RMN de 1H del precursor Z y el compuesto Z a pH 1 en D_2O / DCI.

Señales de 1H	Desplazamientos químicos (ppm)*	Constantes de acoplamiento (Hz) J (1H - 1H , ^{31}P - 1H)	COSY
Precursor Z			
H_a	4,41 (ddd)	22,7 (^{13}P), 13 (H_b), 1,9 (H_c)	H_b , H_c
H_b	4,51 (dt)	13 (H_a), 2,1 (^{31}P), 2,0 (H_c)	H_a , H_c
H_c	4,12 (q) (an)	1,9 (H_a), 1,9 (H_b), 1,9 (^{31}P), 1,9 (H_d)	H_a , H_b , H_d
H_d	4,45 (t) (an)	1,6 (^{31}P), 1,6 (H_c), ~0,8 (H_e)	H_c , H_e
H_e	3,62 (d) (an)	~1,7 (H_f), ~0,8 (H_d)	H_f , H_d
H_f	5,39 (d)	1,7 (H_e)	H_e
Compuesto Z			
H_a'	4,26 (ddd)	22,7 (^{31}P), 12,5 (H_b), 1,9 (H_c)	H_b , H_c
H_b'	4,80 (dt)	12,5 (H_a), 1,9 (^{31}P), 1,9 (H_c)	H_a , H_c
	4,97 (dt) a 315 K		
H_c'	4,64 (q)	1,9 (H_a), 1,9 (H_b), 1,9 (^{31}P), 1,9 (H_d)	H_a , H_b , H_d
H_d'	6,32 (t)	1,6 (^{31}P), 1,6 (H_c)	H_c
H_e'	-	-	-
H_f'	9,39 (s)	-	-

* Los desplazamientos químicos se registraron a 300 K, a menos que se indique lo contrario. Las constantes de acoplamiento se indican entre paréntesis: s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = quinteto. Los picos anchos se indican con (an).

Discusión

El precursor Z se identificó en primer lugar por Wuebbens y Rajagopalan (14) y se describió como estructura de hidropterina con una cadena lateral de cuatro carbonos sustituida en C6 y una función hidroxilo en C1'. En base al estado dihidro y la relativa estabilidad del precursor Z se postuló una estructura quinonoide del precursor Z con un posible tautomerización ceto-enólica en la posición C1' (14). Se derivaron nuevas perspectivas sobre la estructura del Moco a partir de las estructuras cristalinas de la enzima de Mo (24, 34, 35) y se planteó la cuestión de si una MPT no coordinada y/o precursor Z ya poseía una estructura de piranopterina (12). En el estudio presentado en el presente documento, hemos abordado la cuestión y hemos descrito y verificado la estructura de cadenas laterales del precursor Z mediante el uso de espectroscopia EM y de RMN de ¹H sobre cantidades lo suficientemente grandes de precursor Z purificado.

Un objetivo de este estudio era establecer el estado de oxidación del sistema de pterina del precursor Z, para clarificar su papel en relación con la ruta de biosíntesis. La observación de dos protones en C6 (H_e) y C7 (H_f), que muestran un acoplamiento adyacente de 1,7 Hz (COSY) y una diferencia de desplazamiento químico grande, implica que el precursor Z está totalmente hidratado en el anillo de pirazina de la pterina. Una dihidropterina necesitaría un enlace doble bien entre N5 y C6 (7,8-dihidro), bien C6 y C7 (5,8-dihidro) o bien N8 y C7 (5,6-dihidro). En el caso de una 7,8- o 5,8-dihidropterina se perdería el protón H_e, mientras que para la 5,6-dihidropterina la presencia de un enlace doble entre C7 y N8 tendría como consecuencia, debido al efecto de retroceso del enlace doble, tal como se ha observado en otras dihidropterinas (36), un desplazamiento sustancial a una resonancia de campo inferior de la señal de H_f (~7,5 ppm). Además, la diferencia de desplazamiento químico entre ambos protones de pterina (H_e y H_f) de 1,77 ppm es muy parecida a las que se han descrito en los pocos informes sobre piranopterinas sintetizadas químicamente (H_e = 3,1 ppm, H_f = 4,8 ppm en DMSO) (33).

También era importante determinar si hay un doble enlace entre C1' y C2', tal como se ha encontrado en MPT y Moco. La presencia de la señal del precursor Z a 4,41 ppm (H_d), que evidencia el mismo asociado de acoplamiento que en el compuesto Z, permite la asociación del protón en la posición C2'. En consecuencia, la presencia de protones en C2' y C6 excluye la presencia de enlaces dobles bien entre C6 y C1' (14) o bien entre C1' y C2' (26). Debido a que los datos de RMN de ¹H no indicaron la presencia de un protón en C1', era posible que estuviera ubicado un grupo carbonilo en C1', comparable con el del compuesto Z (15, 28). Tanto el espectro de ESI-EM, altamente resuelto, del precursor Z, como también la gran diferencia en el desplazamiento químico (1,87 ppm) para el protón H_d unido a C2' entre el precursor Z y el compuesto Z, no pudieron explicarse con la aromatización del anillo de pterina debida a la oxidación para dar el compuesto Z, sino que se necesita adicionalmente un cambio en los sustituyentes en C1' mediante la formación de un diol dual. Ya que todos los espectros de RMN de ¹H y de ESI-EM se registraron a valores de pH ácidos de 1-3, el diol dual podría ser el producto de una hidratación *in vitro* que se cataliza en condiciones ácidas. Para determinar si se forma un grupo carbonilo en distintas condiciones de pH en una reacción de equilibrio, se registraron espectros de RMN de ¹H a distintos valores de pH (1-10). La única diferencia observable en los espectros fue el ensanchamiento de la señal de H_e y H_f, mientras que H_d no mostró ningún cambio. Con estos datos podemos concluir que el diol dual es el producto principal en todos los valores de pH. La hidratación en la posición C1' de la cadena lateral parece ser una característica general de las tetrahidropterinas, debido a que en un intermedio (6-piruvoil-5,6,7,8-tetrahidropterina) en la biosíntesis de tetrahidropterina se ha detectado un diol dual en la posición C1' con más del 90 % de hidroxilación a pH neutro (37). Además de una hidratación *in vitro* podría existir la posibilidad de una hidratación *in vivo* durante la síntesis del precursor Z. Con estos datos concluimos que el diol dual del precursor Z y otras pterinas reducidas podrían servir como función protectora. Hasta la fecha las teorías planteadas para el mecanismo de biosíntesis del precursor Z (15,38,39) no han contemplado la formación de un diol dual ni la síntesis de una piranopterina. Se ha postulado que la formación del precursor Z discurre mediante una reacción alternativa similar a ciclohidroxilasa con un derivado de guanosina como componente de partida (14,15). Durante la biosíntesis del precursor Z se usan todos los átomos de carbono de la guanosina, debido a que el átomo C8 del imidazol se conserva y en una reacción de reordenamiento se incorpora como C1' en el precursor Z (14,15). Para esta reacción se discute la formación de un éster de formilo transitorio (15) que podría estar unido al extremo C terminal conservado y funcionalmente importante de proteínas de la familia de MOCS1A (40). El diol dual podría ser el producto de la reacción de liberación del formilo durante la síntesis del precursor Z. Además del aumento de estabilidad, el diol dual podría poseer una segunda función biosintética. Hemos demostrado que la MPT-sintasa de E. coli transfiere dos átomos de azufre de dos subunidades pequeñas tiocarboxiladas diferentes al precursor Z, lo que indica la formación de un intermedio con un azufre (18), cuya existencia se ha demostrado hace poco (26). La transferencia del primer azufre acompaña la abertura del fosfato cíclico, lo que indica el ataque inicial en la posición C2'. Esto último tiene sentido con respecto a la reactividad reducida del diol dual en C1' en comparación con una funcionalidad ceto. La segunda etapa de la reacción implicaría la liberación de ambos grupos hidroxilo, así como la transferencia del segundo átomo de azufre.

En resumen, concluimos que la estructura básica del precursor Z es una piranopterina. Este descubrimiento muestra que no solo el Moco sino también ambos intermedios de la ruta de biosíntesis (precursor Z y MPT) están presentes como piranopterinas y que la abertura de esta característica de anillo de pirano, con gran probabilidad, destruye irreversiblemente todos los productos intermedios, incluido el Moco mismo. Tanto la formación del anillo de pirano como también la funcionalidad de diol dual observada en C1' parecen ser importantes para (i) proteger al precursor Z de la oxidación, (ii) conservar la estereoquímica de la posición C6 de pterina y (iii) asegurar la reactividad dirigida del precursor Z en la síntesis de MPT.

Curación de la deficiencia de cofactor de molibdeno mortal mediante un precursor biosintético procedente de *Escherichia coli*

Hemos descrito recientemente la construcción de un modelo animal para deficiencia de Moco humana de tipo A^{B25}. Estos ratones con genes desactivados (knock out) MOCS1 muestran un fenotipo grave que se corresponde con las características bioquímicas de pacientes deficientes en Moco humanos. Los ratones tienen un crecimiento inhibido y mueren dentro de los primeros 12 días después del nacimiento, con un periodo de vida promedio de 7,5 días.

Este fenotipo letal puede rectificarse eficazmente según la invención mediante un intermedio biosintético, precursor Z procedente de *E. coli*.

Resultados

10 Purificación y estabilidad de precursor Z

El precursor Z se purificó hasta la homogeneidad mediante un procedimiento de cromatografía HPLC que comprende tres etapas (Fig. 4), lo que pudo demostrarse tanto mediante espectrometría UV-vis (Fig. 5b) como también mediante espectrometría de masas (no se muestran datos). Para obtener cantidades más grandes, usamos una cepa bacteriana que aumenta la concentración de precursor Z debido a un defecto en la conversión para dar MPT. Otra mejora del rendimiento pudo lograrse mediante la sobreexpresión de las proteínas MoaA y MoaC, que catalizan la primera etapa de la síntesis de Moco. Esto conduce a un aumento de aproximadamente 5000 veces del precursor Z en comparación con las células de tipo silvestre, para un rendimiento promedio de 40 µg por litro de cultivo de *E. coli* y una concentración final de 30-140 µg/ml. El precursor Z purificado mostró el mismo espectro de absorción que se había descrito anteriormente^{B19} y pudo oxidarse cuantitativamente para dar el compuesto Z (Fig. 5a, b). En condiciones fisiológicas y aerobias a pH 6,9 (2x tampón PBS) se oxidó totalmente una solución 22 µM de precursor Z en un periodo de 5 h dando el compuesto Z^{B19}. La semivida de precursor Z a pH 6,9 pudo determinarse en 62±12 min (Fig. 5c).

Restablecimiento de la biosíntesis de MPT *in vitro*

La actividad biológica del precursor Z purificado pudo verificarse mediante una conversión cuantitativa *in vitro* para dar MPT usando MPT-sintasa de *E. coli* purificada^{B26}. Para un exceso doble de MPT-sintasa fuimos capaces de convertir el precursor Z en MPT casi completamente, lo que se determinó mediante análisis de HPLC FormA (no se muestran datos). Para determinar la cantidad de precursor Z que se precisa para un restablecimiento exitoso de la biosíntesis de Moco en ratones deficientes en MOCS1, hemos llevado a cabo una reconstitución *in vitro* con diferentes cantidades de precursor Z en extracto bruto de proteína procedente del hígado de ratones deficientes en MOCS1 de cinco días de edad (Fig. 6a). En caso de uso de 134 ng de precursor Z/mg de proteína pudo lograrse un restablecimiento de la biosíntesis de Moco casi completo, mientras que con 27 ng de precursor Z se obtuvo una reconstitución de aproximadamente el 50 %. La cantidad total de proteína del extracto de hígado usada para este experimento fue de 6 mg (obtenidos a partir de 50 mg de tejido hepático total), lo que requirió una cantidad total necesaria de precursor Z de 0,8 µg por animal para restablecer totalmente la síntesis de MPT en condiciones *in vitro*. En consecuencia, para un animal adulto con un peso corporal de 20 g y una masa de hígado aproximada de 1 g se precisaron 16 µg de precursor Z para lograr un restablecimiento total, pero solo 3 µg para una activación del 50 %. Debido a que las opciones de producción de precursor Z estaban limitadas, en los experimentos siguientes no hemos intentado lograr un restablecimiento completo, sino que solamente hemos usado la dosificación mínima necesaria. Aunque el experimento de valoración *in vitro* no proporcionó ninguna información sobre qué proporción de Moco se transfiere a la aposulfito-oxidasa, la cantidad determinada de precursor Z está relacionada con la capacidad máxima de producción de MPT en el hígado de ratones deficientes en MOCS1.

Curación del fenotipo letal en ratones deficientes en Moco

Pudo demostrarse con seguridad que la pérdida de actividad de sulfito oxidasa es exclusivamente responsable de los daños neurológicos graves que surgen como consecuencia de la deficiencia en Moco^{B11}. La semivida de la sulfito oxidasa en hígado de rata se determinó en 3-4 días^{B27}. Con esta base y mediante los cálculos indicados anteriormente, hemos inyectado precursor Z en los hígados, tal como se resume en la tabla 2. Aunque los animales homocigóticos no tratados en comparación con sus hermanos de la misma camada ganaron peso de un modo claramente más lento y murieron muy pronto^{B25}, fue imposible identificar óptimamente sin determinación del genotipo animales homocigóticos tratados de una camada. Con respecto al peso, el comportamiento u otra característica fenotípica no pudo determinarse hasta el destete ninguna diferencia entre ratones deficientes en MOCS1 tratados con precursor Z e individuos de tipo silvestre o heterocigóticos de una camada.

TABLA 2 Esperanza de vida de ratones *MOCS1*^{-/-} con tratamientos diferentes

Tratamiento ^a	n	Esperanza de vida media (días)
Sin tratamiento ^b	28	75
0,2 µg cada dos días	11	17,7
1 µg cada tres días	5	25,2
1 µg (antes del destete ^c) y 2 µg (después del destete) cada tres días	30	32,9
2 µg de precursor Z cada dos días	15	47,4
2 µg (antes del destete) y 4 µg (después del destete) cada tres días	18	91,8

^aEl precursor Z se inyectó a través de la piel en el hígado.

^bDatos de la fuente B16.

^cEl destete tuvo lugar entre el día 20 y el 30 después del nacimiento.

Tal como se deduce de la tabla 2, existe una correlación fuerte entre la cantidad de precursor Z inyectada por semana y la esperanza de vida promedio de ratones deficientes en *MOCS1*. La dosificación mínima es de 0,2 µg de precursor Z, administrada cada dos días. En este tratamiento 11 ratones *MOCS1*^{-/-} procedentes de tres camadas se desarrollaron normalmente y ganaron peso de forma correspondiente con sus hermanos. Aunque no pudo determinarse ninguna diferencia de comportamiento, a los 11 animales homocigóticos los mataron sus padres de forma selectiva los días 14 y 19. Para una toma de 1-2 cada tres días los ratones alcanzaron una edad superior y estuvieron mamando hasta el día 20-30, pero después los animales *MOCS1*^{-/-} parecieron más lentos en sus reacciones de huida y en la percepción de su entorno que los animales control correspondientes. Esta diferencia desapareció alrededor del día 40; a partir de entonces todos los animales *MOCS1* fueron tal ágiles y vivaces como los individuos de control. Aproximadamente la mitad de los animales tratados murieron entre los días 20 y 40. Se demostró que la inyección de 2-4 µg de precursor Z cada tres días era el tratamiento más exitoso. Durante este tratamiento no murió ningún animal entre los días 40 y 70, un periodo en el que machos y hembras alcanzan el estado adulto y capacidad reproductora. Diez parejas de estos animales tratados, entre sí y cuatro heterocigotos *MOCS1* adicionales (dos parejas con machos homocigóticos y dos con hembras homocigóticas) produjeron vástagos sanos que se desarrollaron normalmente, que en el caso del fenotipo *MOCS1*^{-/-} debieron tratarse de nuevo con precursor Z.

Prevención de daños neurológicos

La actividad general de los animales tratados (2-4 µg de precursor Z cada tres días) se determinó en el ensayo en "campo abierto", no produciendo los parámetros examinados (movimiento, aprendizaje, comportamiento social) ninguna diferencia significativa entre animales de tipo silvestre (n=6) y homocigóticos (n=8) de una camada. Se examinó la evitación de luz en la caja de luz/oscuridad disponiendo los animales en la zona iluminada y determinando el tiempo hasta que los animales buscaron la zona oscura. Tampoco este ensayo produjo ninguna

diferencia significativa entre ratones de tipo silvestre y ratones deficientes en *MOCS1* tratados con precursor Z (no se muestran datos).

5 No se determinaron limitaciones del movimiento para ratones deficientes en *MOCS1* y tratados con receptor Z en el ensayo en la rueda giratoria (10 y 20 revoluciones por minuto, datos no mostrados). La capacidad de aprendizaje de ratones deficientes en *MOCS1*, a los que se administró regularmente precursor Z, se determinó en un laberinto de agua subdividido en cuatro sectores que tenía una plataforma no visible en un sector. Los resultados se compararon con ratones de control de tipo silvestre. Los ratones se dispusieron secuencialmente en los cuatro sectores y se midió el tiempo que tardaban en encontrar la plataforma y subirse a la misma (Fig. 7). En la primera serie de ensayos los ratones con genes inactivados "knock out" (n=6) tratados encontraron la plataforma más rápidamente que los ratones de control de tipo silvestre (n=6). En una segunda serie de ensayos disminuyó el tiempo de nado promedio de forma uniforme al 20-25 % del primer ensayo tanto para ratones con genes inactivados (knock out) tratados como también para animales de control. En una tercera serie de ensayo se retiró la plataforma y se midió el tiempo que pasaban los ratones en el sector "correcto", el que contenía la plataforma anteriormente. Ambos grupos pasaron aproximadamente el 50 % del tiempo en el sector correcto.

15 Aparición del fenotipo de deficiencia después de cesar el tratamiento

Para investigar si el tratamiento con precursor Z puede regularse después de un determinado estado de desarrollo, retiramos la inyección de precursor Z a mutantes homocigóticos los días 1 (n=3), 12 (n=4), 26-28 (n=3) y 64-68 (n=2) después del nacimiento. Una única inyección de precursor Z el día 1 llevó a la muerte después de 15-18 días. El cese del tratamiento con precursor Z el día 12 tuvo como consecuencia una exploración reducida del entorno, comenzando el día 18 (es decir, 6 días después de la última inyección), y la muerte de los animales 1-3 días después (es decir, 7-9 días después de la última inyección). A la edad de 26-28 días, que entra dentro del periodo crítico descrito anteriormente, la retirada de precursor Z tuvo como consecuencia la muerte dentro de un periodo de 4-7 días. El cese después de 64-68 días tuvo como consecuencia una exploración reducida del entorno después de 7 días y la muerte después de 9-10 días. Para suprimir exitosamente el fenotipo, debe comenzarse la administración del precursor Z dentro de un periodo de 5 días después del nacimiento. Un comienzo del tratamiento después de 7 o 10 días no tiene como consecuencia ninguna mejora significativa del fenotipo o de la esperanza de vida (datos no mostrados).

Restablecimiento de la síntesis de Moco y de la actividad de enzimas dependientes de Moco *in vivo*

30 En animales *MOCS1*^{-/-} homocigóticos, a los que se inyectó regularmente precursor Z y que parecen normales con respecto a su peso, aspecto y comportamiento, se detuvo el tratamiento y los animales se sacrificaron secuencialmente el día 0, 1, 4 y 7 después de la última inyección, para determinar el contenido en MPT y las actividades de enzimas de Mo en el hígado (Fig. 6b-d). El día de la inyección se midió, debido a la rápida conversión del precursor Z administrado en MPT, el valor máximo de MPT (16 ± 1 % del tipo silvestre; Fig. 6b). Dentro de los cuatro días siguientes se redujo el contenido en MPT continuamente a menos del 4 % del valor del tipo silvestre.

35 La actividad de la sulfito oxidasa mostró un aumento del día 0 al día 1 después de la última inyección (Fig. 6c). Tanto la actividad de la sulfito oxidasa como también de la xantina deshidrogenasa alcanzaron un valor relativo (indicado en % del tipo silvestre) que era superior al contenido de MPT reconstituido (Fig. 6d). Después del día 1 disminuyó rápidamente la actividad de xantina deshidrogenasa. Las investigaciones morfológicas de ratones con genes inactivados tratados con precursor Z produjeron riñones anormales en ambos lados a partir del día 20 después del nacimiento (Fig. 8a, b). Esto se correlaciona con los valores muy elevados de xantina, así como con valores no medibles de ácido úrico en la urea (datos no mostrados). Además de daños renales no se observó ninguna otra anomalía morfológica. Se examinaron tejidos del corazón, músculo esquelético, pulmón, páncreas, tiroide, bazo e hígado (datos no mostrados), así como de cerebro (Fig. 8c-d).

Discusión

45 El restablecimiento de la biosíntesis de Moco por medio del precursor Z bacteriano *in vivo* e *in vitro* apoya la indicación genética de una ruta de síntesis única y altamente conservada que tiene como consecuencia la actividad de Moco y de enzimas dependientes de Moco¹². Observamos una correlación clara entre la cantidad administrada regularmente de precursor Z y la esperanza de vida de ratones deficientes en *MOCS1* (Tabla 2). El asesinato selectivo de los vástagos afectados por los padres siguiendo la dosificación más baja administrada en el presente documento podría indicar bien un olor diferente, provocado posiblemente por valores elevados de compuestos que contienen azufre, o bien cambios leves en el comportamiento social. La alta mortalidad entre los días 20 y 40 después del nacimiento, que se observa después del tratamiento con cantidades promedio de precursor Z ($1-2 \mu$) y el cese del tratamiento, podría deberse a una fase crítica en el desarrollo del cerebro, durante la que los animales muy sensibles reaccionan a concentraciones de sulfito aumentadas o a concentraciones de sulfato reducidas. En caso de una dosificación alta aumenta la actividad de la sulfito oxidasa dentro de los primeros días de inyecciones de precursor Z en el hígado, lo que indica que (i) la apoenzima que capta el Moco es menos estable que la holoenzima, (ii) las moléculas de apoenzima disponibles se saturan con Moco rápidamente y (iii) la apoenzima debe sintetizarse nuevamente para captar el Moco total disponible. En comparación con el valor del tipo silvestre, la actividad de la sulfito oxidada, así como también la de la xantina deshidrogenasa, supera el porcentaje de MPT

restablecida (Fig. 6). Este entendimiento permite deducir una incorporación muy eficaz de Moco disponible en la apoenzima, así como una fracción de Moco en el tipo silvestre que no está unido a la enzima de Mo. Además, este entendimiento concuerda con las observaciones anteriores en líneas celulares deficientes en gefirina, en las que cantidades reducidas de Moco restablecido conducen a una actividad sobreproporcionalmente alta de la sulfito oxidasa^{B22}.

En la medida de nuestro conocimiento, la estabilidad de la xantina deshidrogenada *in vivo* no se ha determinado hasta la fecha, pero la semivida del ARNm asociado se ha estimado en 12-16 horas, lo que corresponde a la magnitud de la semivida de la actividad enzimática tal como se estimó en base a las diferencias entre el día 1 y el 4 después de la inyección de precursor Z (Fig. 6d). La actividad de la sulfito oxidasa corresponde después de alcanzar el máximo el día 1 a la semivida publicada de los días 3-4^{B27} (Fig. 6c). Posiblemente, la actividad promedio de la xantina deshidrogenada es, debido a las fuertes fluctuaciones, inferior a la actividad de la sulfito oxidasa. Este es el motivo principal de la aparición de piedras de xantina en xantínurea humana clásica (tipo 1) y finalmente es responsable de insuficiencia renal y parece ser también, por lo tanto, la causa de muerte en animales tratados más viejos después de 70 días. La xantínurea humana permanece, no obstante, hasta la ausencia total de actividad de xantina deshidrogenada, sin síntomas en la mayor parte de los casos^{B29} e incluso en los casos con síntomas conduce solo raramente a estados que suponen un riesgo para la vida. Por lo tanto, en este contexto puede considerarse una influencia adicional de la deficiencia de sulfito oxidasa sobre la función renal. Por lo tanto, el tratamiento de la deficiencia de Moco humano debería dirigirse en primer lugar al restablecimiento de la actividad de sulfito oxidasa.

Hasta la fecha no se ha descrito ningún tratamiento eficaz para pacientes con deficiencia en Moco^{B11}. Para la rara deficiencia de tipo C que está provocada por mutaciones de gefirina, hemos demostrado el restablecimiento en un cultivo de fibroblastos por medio de molibdato, lo que ya indica que incluso pequeñas cantidades de Moco activo son suficientes para lograr un restablecimiento del fenotipo normal^{B22}. Debido a que dos tercios de los pacientes conocidos con deficiencia en Moco pertenecen al grupo de deficiencia A^{B10,B12} y todos los componentes para una conversión de precursor Z a MPT están presentes en estos pacientes^{B20,B24}, el precursor Z purificado representa el primer remedio potencialmente efectivo para la mayor parte de pacientes de Moco.

La administración intravenosa de precursor Z es una opción de uso atractiva para pacientes humanos. No obstante, esto incluye no solo una nueva magnitud en la producción de precursor Z para que se corresponda con el peso corporal humano, 1000 veces superior, sino también una dilución fuerte antes de que el principio activo alcance las células hepáticas. Por lo tanto, debe considerarse el uso de un sistema de administración permanente al hígado en seres humanos. Debido a que los ratones MOCS^{-/-} con respecto a los parámetros bioquímicos se corresponden con el fenotipo de pacientes humanos, un tratamiento de deficiencia humana con precursor Z al nivel de restablecimiento enzimático y normalización del metabolismo parece muy prometedor.

Se debe determinar si un comienzo retardado del tratamiento descrito (lo que en la mayor parte de los casos debe esperarse debido al periodo necesario para la detección clínica y el diagnóstico) es aún adecuado para prevenir daños neurológicos. El tratamiento con precursor Z descrito constituye la base para una investigación detallada de la progresión o la no aparición de estos síntomas, debido a que ahora somos capaces de inducir deficiencia en Moco en un modelo animal en cualquier momento modificando la dosificación del principio activo.

La deficiencia en tetrahidrobiopterina^{B30} es un defecto similar en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina, lo que conduce a una pérdida de NO-sintasas^{B32} y las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos^{B31}, que son esenciales para la síntesis de neurotransmisores (dopamina y serotonina). Las posibilidades de la síntesis química posibilitaron ya en 1979 el primer tratamiento exitoso de un paciente con deficiencia en tetrahidrobiopterina^{B33,B34}, lo que desde entonces ha representado un tratamiento establecido^{B30}. Por lo tanto, los resultados de nuestro trabajo recomiendan enérgicamente estudios clínicos para el tratamiento de pacientes deficientes en Moco, tan pronto como pueden producirse cantidades suficientes de precursor Z purificado.

Bibliografía

1. Hille, R. (1996) *Chem. Rev.* **96**, 2757-2816.
2. Stiefel, E. I. (1996) *Science* **272**, 1599-1600.
3. Enemark, J. H. y Cosper, M. M. (2002) *Met. Ions Biol. Syst.* **39**, 621-654.
4. Mendel, R. R., Schwarz, G. (1999) *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**, 33-69.
5. Johnson, J. L., Hainline, B. E. y Rajagopalan, K. V. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1783-1786.
6. Schindelin, H., Kisker, C. y Rajagopalan, K. V. (2001) *Adv. Protein Chem.* **58**, 47-94.
7. Mendel, R. R. y Schwarz, G. (2002) *Met. Ions Biol. Syst.* **39**, 317-368.
8. Duran, M., Beemer, F. A., van de Heiden, C., Korteland, J., de Bree, P. K., Brink, M., Wadman, S. K. y Lombeck, I.

- (1978) *J. Inherit. Metab. Dis.* **1**, 175-178.
9. Reiss, J. y Johnson, J. L. (2003) *Hum. Mutat.* **21**, 569-576.
10. Johnson, J. L. y Duran, M. (2001) en *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. y Valle, D., ed), 8ª ed., páginas 3163-3177, McGraw-Hill, Nueva York.
- 5 11. Fischer, B. y Burgmayer, S. J. (2002) *Met. Ions Biol. Syst.* **39**, 265-316.
12. Fischer, B., Enemark, J. H. y Basu, P. (1998) *J. Inorg. Biochem.* **72**, 13-21.
13. Rajagopalan, K. V. y Johnson, J. L. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10199-10202.
14. Wuebbens, M. M. y Rajagopalan, K. V. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13493-13498.
- 10 15. Rieder, C., Eisenreich, W., O'Brien, J., Richter, G., Götze, E., Boyle, P., Blanchard, S., Bacher, A. y Simon, H. (1998) *Eur. J. Biochem.* **255**, 24-36.
16. Pitterle, D. M. y Rajagopalan, K. V. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 3373-3378.
17. Pitterle, D. M., Johnson, J. L. y Rajagopalan, K. V. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13506-13509.
18. Gutzke, G., Fischer, B., Mendel, R. R., and Schwarz, G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 36268-36274.
19. Rudolph, M. J., Wuebbens, M. M., Rajagopalan, K. V. y Schindelin, H. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 42-46.
- 15 20. Kuper, J., Palmer, T., Mendel, R. R. y Schwarz, G. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 6475-6480.
21. Nichols, J. y Rajagopalan, K. V. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 24995-25000.
22. Johnson, J. L., Bastian, N. R. y Rajagopalan, K. V. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 3190-3194.
23. Rajagopalan, K. V. (1996) en *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* (Neidhardt, F. C., ed), páginas 674-679, ASM Press, Washington D.C.
- 20 24. Romao, M. J., Archer, M., Moura, I., Moura, J. J., LeGall, J., Engh, R., Schneider, M., Hof, P. y Huber, R. (1995) *Science* **270**, 1170-1176.
25. Chan, M. K., Mukund, S., Kletzin, A., Adams, M. W. W. y Rees, D. C. (1995) *Science* **267**, 1463-1469.
26. Wuebbens, M. M. y Rajagopalan, K. V. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 14523-14532.
27. Doyle, W. A., Burke, J. F., Chovnick, A., Dutton, F. L., Whittle, J. R. y Bray, R. C. (1996) *Eur. J. Biochem.* **239**, 782-795.
28. Johnson, J. L., Wuebbens, M. M. y Rajagopalan, K. V. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13440-13447.
29. Reiss, J., Kleinhofs, A. y Klingmuller, W. (1987) *Mol. Gen. Genet.* **206**, 352-355.
30. Rivers, S. L., McNairn, E., Blasco, F., Giordano, G. y Boxer, D. H. (1993) *Mol. Microbiol.* **8**, 1071-1081.
31. Leimkuhler, S. y Rajagopalan, K. V. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 22024-22031.
- 30 32. Schafer, A., Paul, H., Fischer, B., Hesse, M. y Visconfini, M. (1995) *Helv. Chim. Acta* **78**, 1763-1776.
33. Soyka, R., Pfeleiderer, W. y Prewo, R. (1990) *Helv. Chim. Acta* **73**, 808-826.
34. Schindelin, H., Kisker, C., Hilton, J., Rajagopalan, K. V. y Rees, D. C. (1996) *Science* **272**, 1615-1621.
35. Kisker, C., Schindelin, H., Pacheco, A., Wehbi, W. A., Garrett, R. M., Rajagopalan, K. V., Enemark, J. H. y Rees, D. C. (1997) *Cell* **91**, 973-983.
36. Pfeleiderer, W. (1996) en *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (Katritzky, A. R., Reese, C. W. y Scriven, E. F., ed.) vol. 7, páginas 679, Pergamon, Oxford.
37. Bracher, A., Eisenreich, W., Schramek, N., Ritz, H., Gotze, E., Herrmann, A., Gutlich, M. y Bacher, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 28132-28141.
38. Irby, R. B. y Adair, W. L., Jr. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 23981-23987.
- 40 39. Wuebbens, M. M. y Rajagopalan, K. V. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 1082-1087.

40. Hänzelmann, P., Schwarz, G. y Mendel, R. R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 18303-18312.
- B1. Rajagopalan, K. V. y Johnson, J. L. The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.* **267**, 10199-10202 (1992).
- B2. Wahl, R. C., Hageman, R. V. y Rajagopalan, K. V. The relationship of Mo, molybdopterin, and the cyanolyzable sulfur in the Mo cofactor. *Arch. Biochem. Biophys.* **230**, 264-273 (1984).
- 5 B3. Reiss, J. y col. Mutations in a polycistronic nuclear gene associated with molybdenum cofactor deficiency. *Nat. Genet.* **20**, 51-53 (1998).
- B4. Stallmeyer, B., Drugeon, G., Reiss, J., Haenni, A. L. y Mendel, R. R. Human molybdopterin synthase gene: identification of a bicistronic transcript with overlapping reading frames. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 698-705 (1999).
- 10 B5. Stallmeyer, B. y col. The neurotransmitter receptor-anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants, and mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 1333-1338 (1999).
- B6. Mendel, R. R. y Schwarz, G. Biosynthesis and molecular biology of the molybdenum cofactor (Moco). *Met. Ions Biol. Syst.* **39**, 317-368. (2002).
- B7. Rajagopalan, K. V. Biosynthesis of the molybdenum cofactor in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (ed. Neidhardt, F. C.) 674-679 (ASM Press, Washington D. C., 1996).
- 15 B8. Duran, M. y col. Combined deficiency of xanthine oxidase and sulphite oxidase: a defect of molybdenum metabolism or transport? *J. Inherit. Metab. Dis.* **1**, 175-178 (1978).
- B9. Johnson, J. L. y col. Inborn errors of molybdenum metabolism: combined deficiencies of sulfite oxidase and xanthine dehydrogenase in a patient lacking the molybdenum cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 3715-3719. (1980).
- 20 B10. Reiss, J. Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Hum. Genet.* **106**, 157-163. (2000).
- B11. Johnson, J. L. y Duran, M. Molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency. en *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (ed. Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. y Valle, D.) 3163-3177 (McGraw-Hill, Nueva York, 2001).
- B12. Reiss, J. y Johnson, J. L. Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2, and GEPH. *Hum. Mutat.* **21**, 569-576. (2003).
- 25 B13. Johnson, J. L. y col. Molybdopterin synthase mutations in a mild case of molybdenum cofactor deficiency. *Am. J. Med. Genet.* **104**, 169-173. (2001).
- B14. Johnson, J. L., Rajagopalan, K. V. y Wadman, S. K. Human molybdenum cofactor deficiency. *Adv. Exp. Med. Biol.* **338**, 373-378 (1993).
- 30 B15. Hoff, T., Schnorr, K. M., Meyer, C. y Caboche, M. Isolation of two *Arabidopsis* cDNAs involved in early steps of molybdenum cofactor biosynthesis by functional complementation of *Escherichia coli* mutants. *J. Biol. Chem.* **270**, 6100-6107 (1995).
- B16. Gray, T. A. y Nicholls, R. D. Diverse splicing mechanisms fuse the evolutionarily conserved bicistronic MOCS1A and MOCS1B open reading frames. *RNA* **6**, 928-936 (2000).
- 35 B17. Hänzelmann, P., Schwarz, G. y Mendel, R. R. Functionality of alternative splice forms of the first enzymes involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 18303-18312 (2002).
- B18. Gross-Hardt, S. y Reiss, J. The bicistronic MOCS1 gene has alternative start codons on two mutually exclusive exons. *Mol. Genet. Metab.* **76**, 340-343 (2002).
- 40 B19. Wuebbens, M. M. y Rajagopalan, K. V. Structural characterization of a molybdopterin precursor. *J. Biol. Chem.* **268**, 13493-13498 (1993).
- B20. Johnson, J. L., Wuebbens, M. M., Mandell, R. y Shih, V. E. Molybdenum cofactor biosynthesis in humans. Identification of two complementation groups of cofactor-deficient patients and preliminary characterization of a diffusible molybdopterin precursor. *J. Clin. Invest.* **83**, 897-903 (1989).
- 45 B21. Reiss, J. y col. Human molybdopterin synthase gene: genomic structure and mutations in molybdenum cofactor deficiency type B. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 706-711 (1999).
- B22. Reiss, J. y col. A mutation in the gene for the neurotransmitter receptor-clustering protein gephyrin causes a novel form of molybdenum cofactor deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 208-213. (2001).

- B23. Johnson, J. L., Wuebbens, M. M. y Rajagopalan, K. V. The structure of a molybdopterin precursor. Characterization of a stable, oxidized derivative. *J. Biol. Chem.* **264**, 13440-13447 (1989).
- B24. Johnson, J. L. y Rajagopalan, K. V. Molybdopterin biosynthesis in man. Properties of the converting factor in liver tissue from a molybdenum cofactor deficient patient. *Adv. Exp. Med. Biol.* **338**, 379-382 (1993).
- 5 B25. Lee, H.-J. y col. Molybdenum cofactor-deficient mice resemble the phenotype of human patients. *Hum. Mol. Gen.* **11**, 3309-3317 (2002).
- B26. Gutzke, G., Fischer, B., Mendel, R. R. y Schwarz, G. Thiocarboxylation of molybdopterin synthase provides evidence for the mechanism of dithiolene formation in metal-binding pterins. *J. Biol. Chem.* **276**, 36268-36274. (2001).
- 10 B27. Ono, H. e Ito, A. Transport of the precursor for sulfite oxidase into intermembrane space of liver mitochondria: characterization of import and processing activities. *J. Biochem. (Tokio)* **95**, 345-352. (1984).
- B28. Falciani, F., Ghezzi, P., Terao, M., Cazzaniga, G. y Garattini, E. Interferons induce xanthine dehydrogenase gene expression in L929 cells. *Biochem. J.* **285**, 1001-1008. (1992).
- B29. Simmonds, H. A., Reiter, S. y Nishino, T. Xantinura hereditaria en *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (ed. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. y Valle, D.) 1781-1797 (McGraw-Hill, Nueva York, 1995).
- 15 B30. Blau, N., Thöny, B., Cotton, R. G. H. y Hyland, K. Disorders of Tetrahydrobiopterin and Related Biogenic Amines. en *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (eds. Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. y Valle, D.) 1725-1776 (McGraw-Hill, Nueva York, 2001).
- 20 B31. Fitzpatrick, P. F. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 355-381. (1999).
- B32. Alderton, W. K., Cooper, C. E. y Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593-615. (2001).
- B33. Schircks, B., Bieri, J. H. y Viscontini, M. [Preparation and characterisation of pure 5,6,7,8-tetrahydro-L-neopterin and 5,6,7,8-tetrahydro-D-monapterine (author's transl)]. *Helv. Chim. Acta* **59**, 248-252. (1976).
- 25 B34. Niederwieser, A., Curtius, H. C., Viscontini, M., Schaub, J. y Schmidt, H. Phenylketonuria variants. *Lancet* **1**, 550. (1979).
- B35. Rivers, S. L., McNairn, E., Blasco, F., Giordano, G. y Boxer, D. H. Molecular genetic analysis of the moa operon of *Escherichia coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **8**, 1071-1081 (1993).
- 30 B36. Reiss, J., Kleinhofs, A. y Klingmuller, W. Cloning of seven differently complementing DNA fragments with ch1 functions from *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **206**, 352-355 (1987).
- B37. Leimkuhler, S. y Rajagopalan, K. V. A sulfurtransferase is required in the transfer of cysteine sulfur in the *in vitro* synthesis of molybdopterin from precursor Z in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**, 22024-22031. (2001).
- B38. Nason, A. y col. Invitro formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: nitrate reductase from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum-enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **68**, 3242-3246 (1971).
- 35 B39. Morris, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* **11**, 47-60. (1984).
- B40. Schwarz, G., Boxer, D. H. y Mendel, R. R. Molybdenum cofactor biosynthesis. The plant protein Cnx1 binds molybdopterin with high affinity. *J. Biol. Chem.* **272**, 26811-26814 (1997).
- 40 B41. Johnson, J. L. y col. Prenatal diagnosis of molybdenum cofactor deficiency by assay of sulphite oxidase activity in chorionic villus samples. *J. Inherit. Metab. Dis.* **14**, 932-937 (1991).
- B42. Mendel, R. R. y Müller, A. J. A common genetic determinant of xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in *Nicotiana tabacum*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **170**, 538-541 (1976).
- 45 B43. Koshiba, T., Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N. y Sato, M. Purification and properties of flavin- and molybdenum containing aldehyde oxidase from coleoptyles of maize. *Plant Physiol.* **110**, 781-789 (1996).

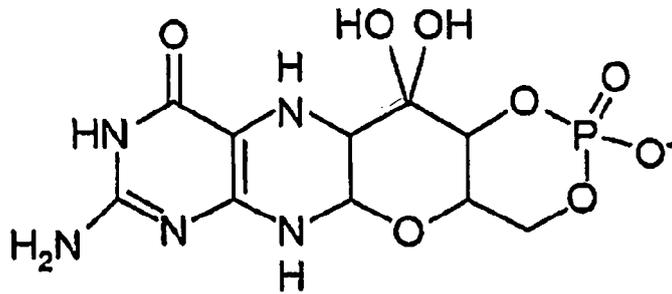
Se han utilizado las siguientes abreviaciones:

1D, monodimensional; 2D, bidimensional; COSY, espectroscopia de correlación; ESI, ionización por

electropulverización; EM, espectrometría de masas; MPT, molibdopterina o piranopterina-en-ditiolato unido a metal; Mo, molibdeno; RMN, resonancia magnética nuclear; W, wolframio.

REIVINDICACIONES

1. Uso de precursor Z para la preparación de un agente para el tratamiento de deficiencia del cofactor de molibdeno humano que se atribuye directa o indirectamente a una síntesis del cofactor de molibdeno alterada, caracterizado porque como componente esencial de este agente se usa precursor Z.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque el precursor Z presenta como fórmula molecular $C_{10}H_{14}N_5O_8P$, representa una piranopterina y posee un diol geminal en la cadena lateral.
3. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque el precursor Z presenta como fórmula molecular $C_{10}H_{14}N_5O_8P$, representa una piranopterina y posee un diol geminal en la posición C1'.
4. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque el precursor Z presenta como fórmula estructural



10

representa una piranopterina y posee un diol geminal en la posición C1'.

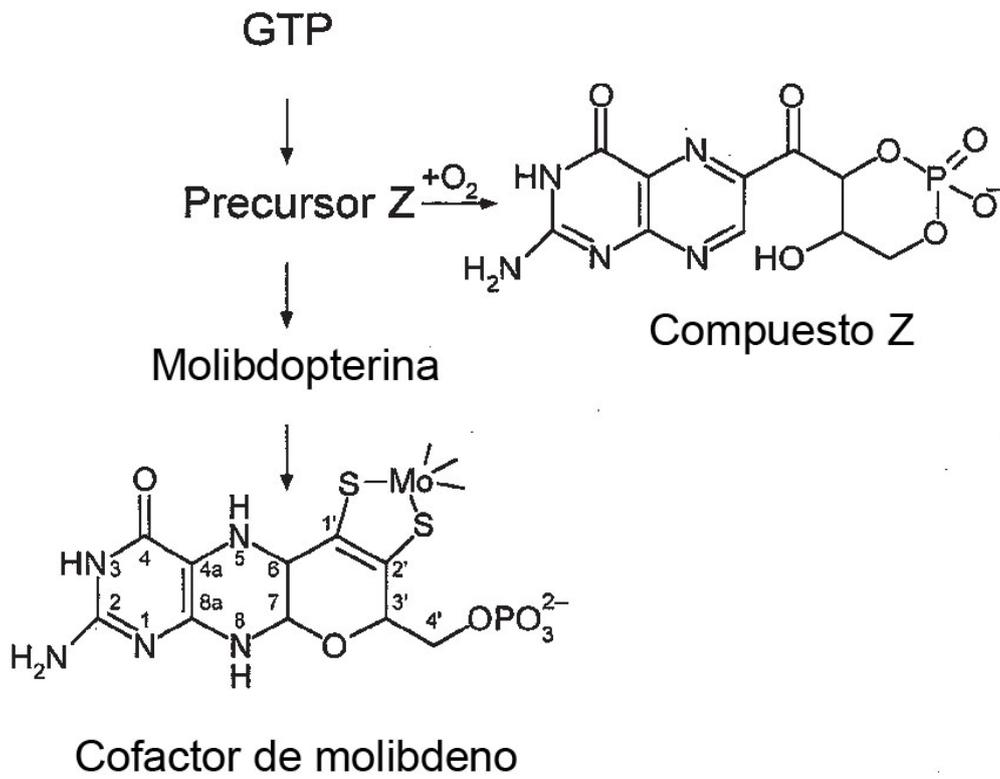


Fig. 1

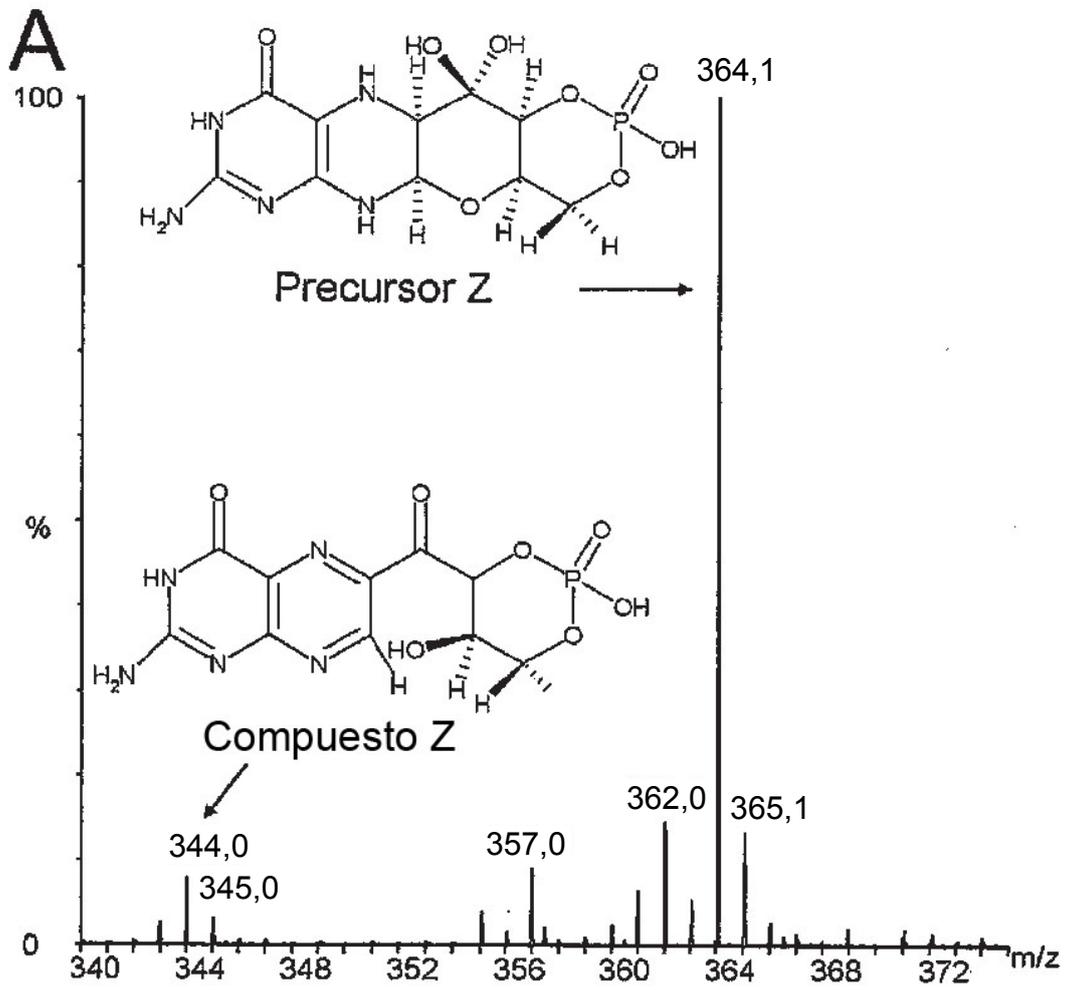


Fig. 2A

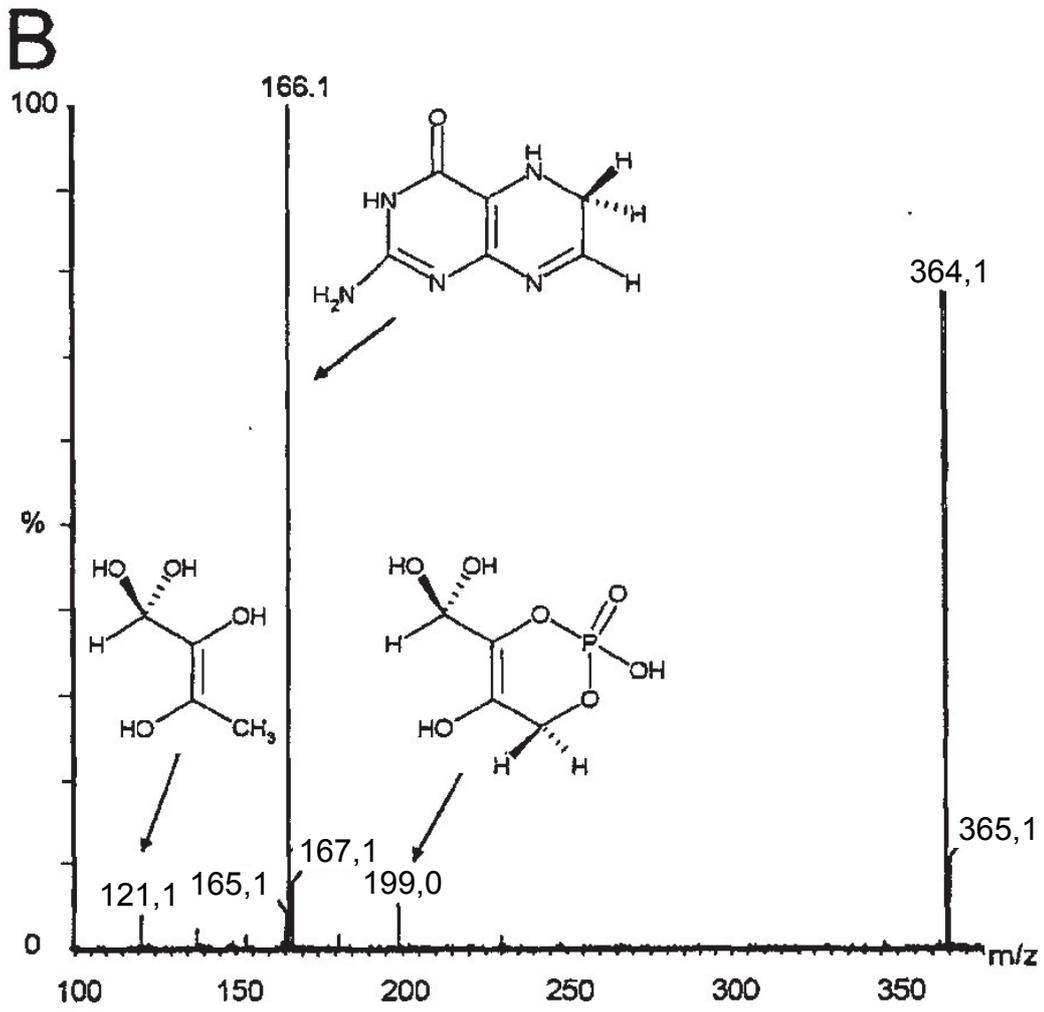


Fig. 2B

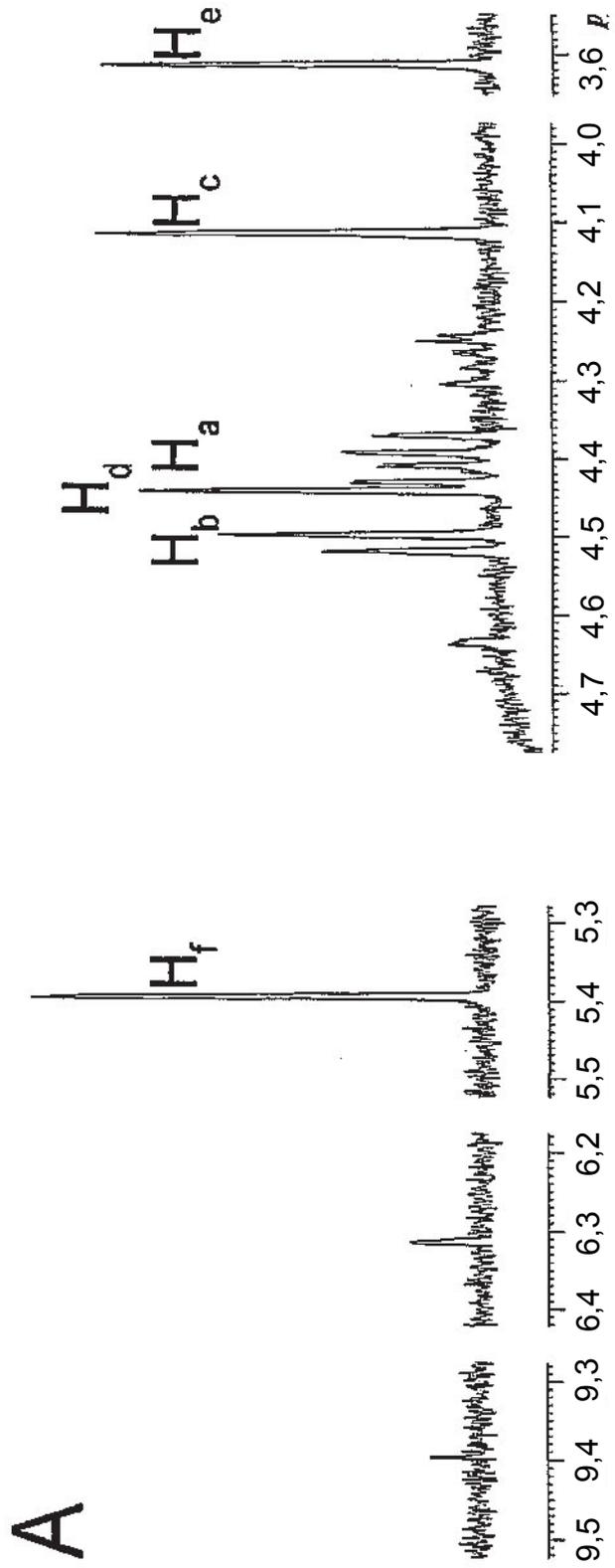


Fig. 3 A

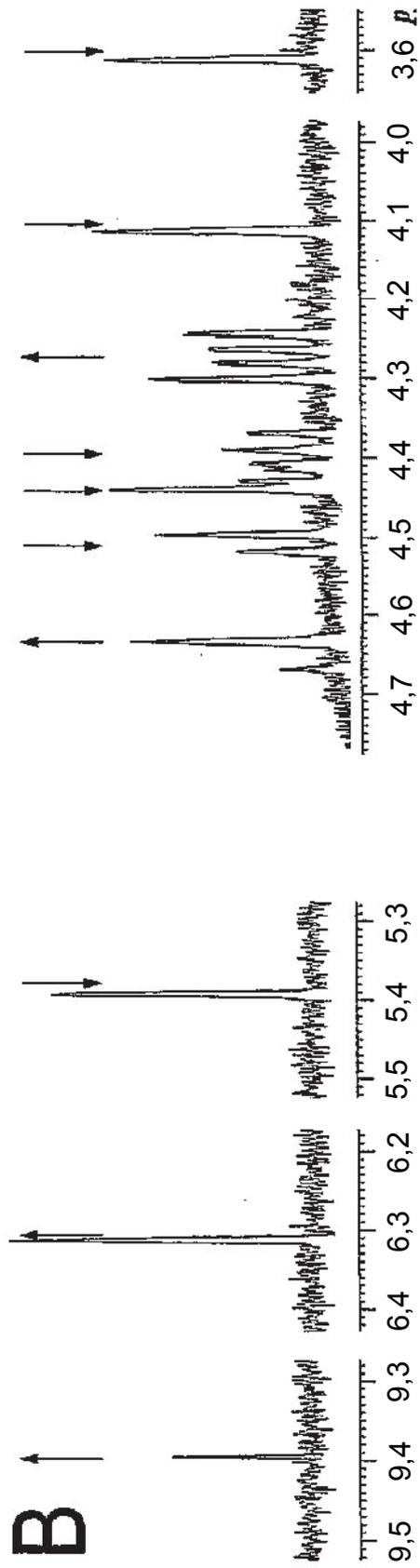


Fig. 3 B

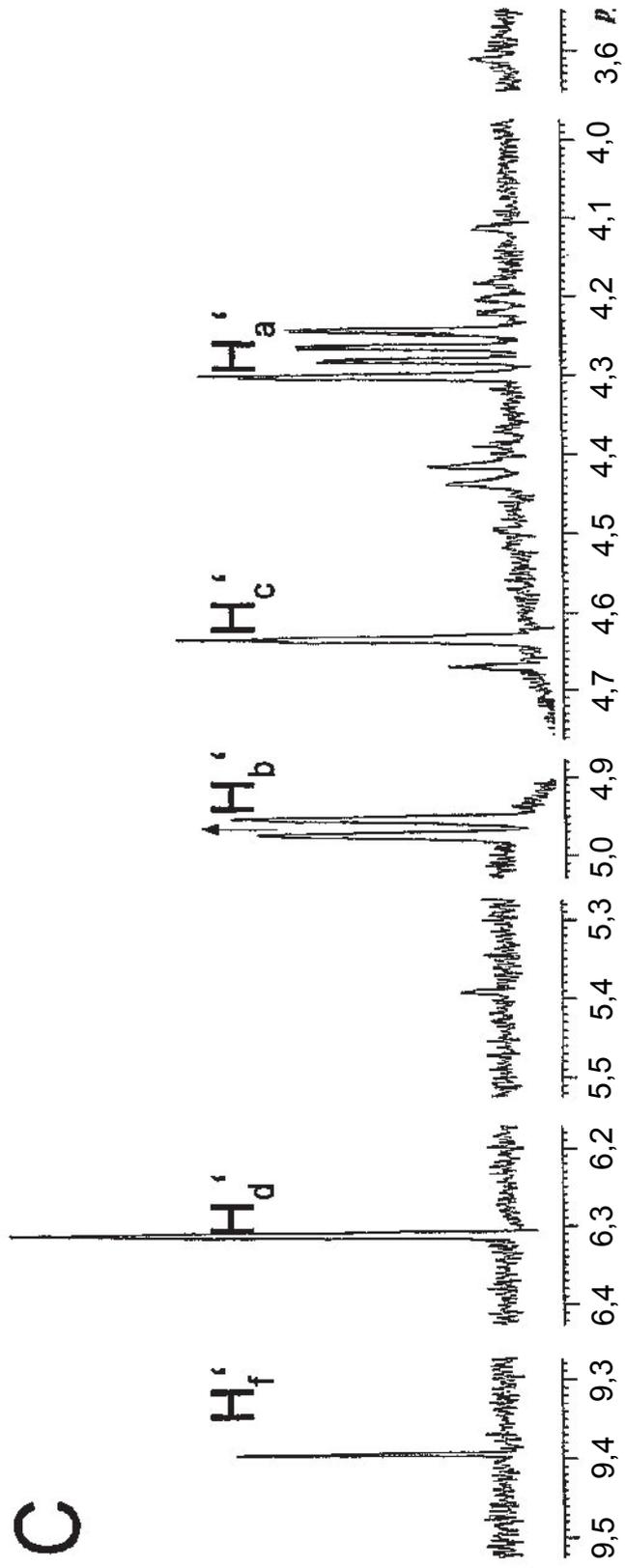


Fig. 3 C

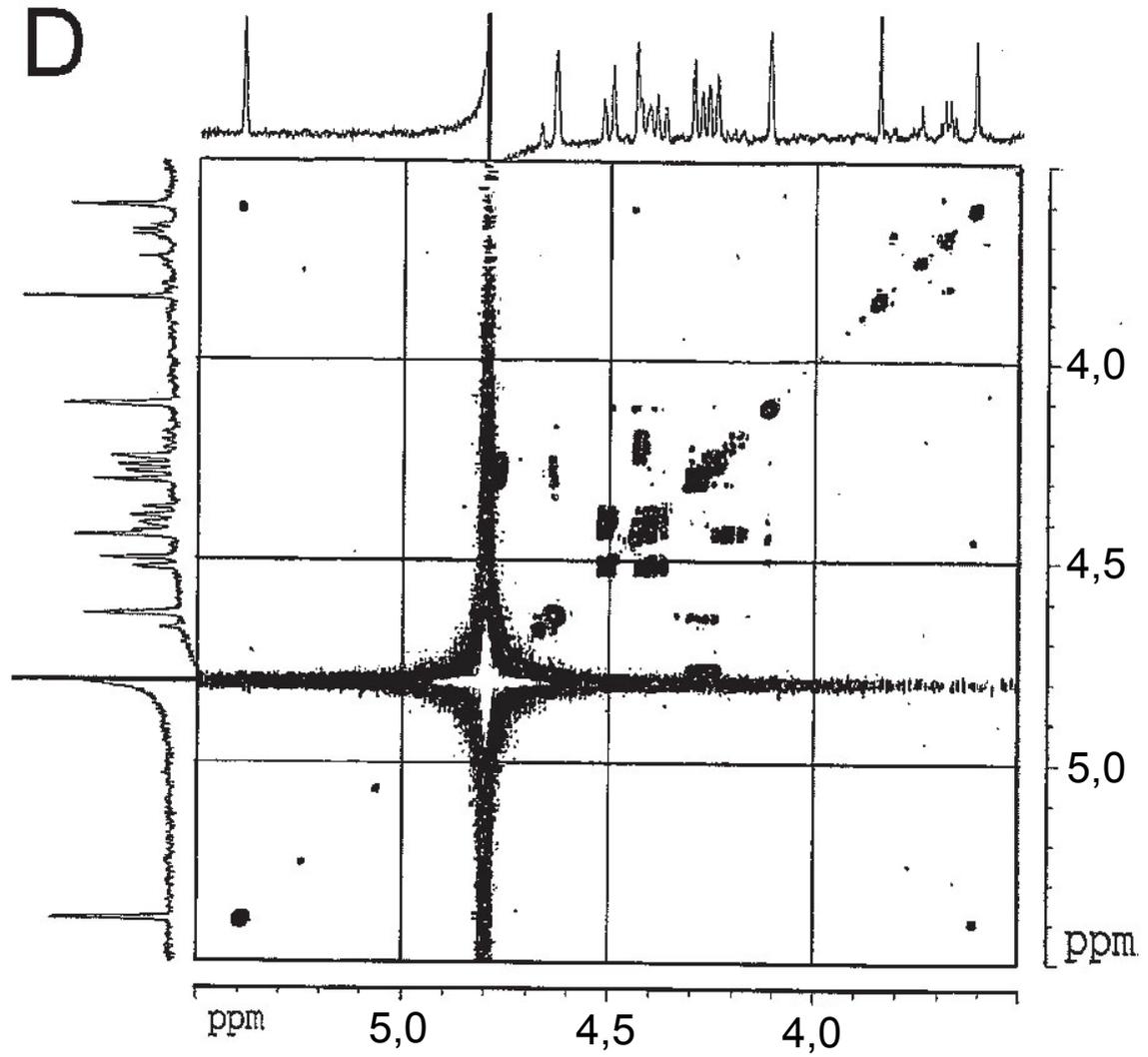
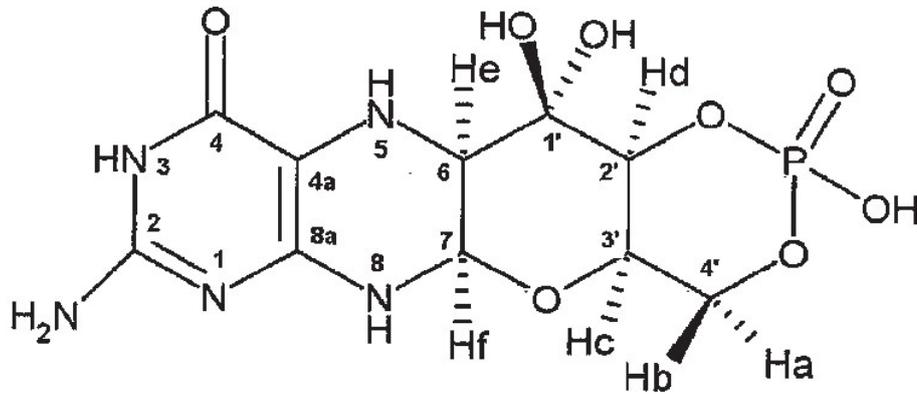


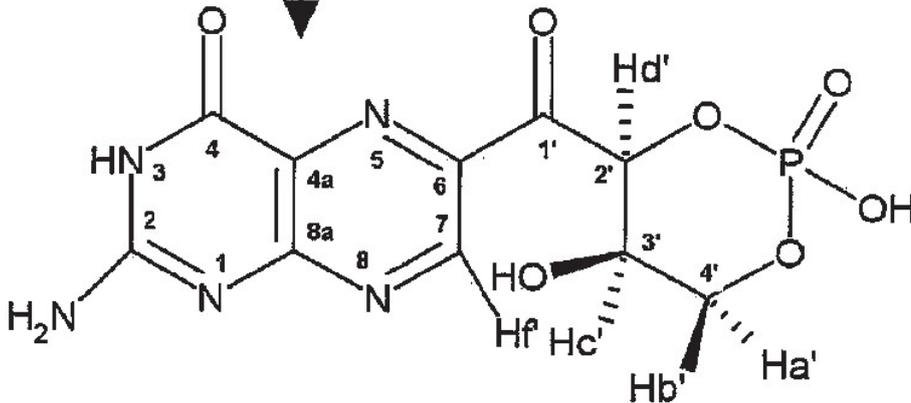
Fig. 3 D

E



Precursor Z ($C_{10}H_{14}N_5O_8P = 363$ Da)

oxidación



Compuesto Z ($C_{10}H_{14}N_5O_7P = 343$ Da)

Fig. 3 E

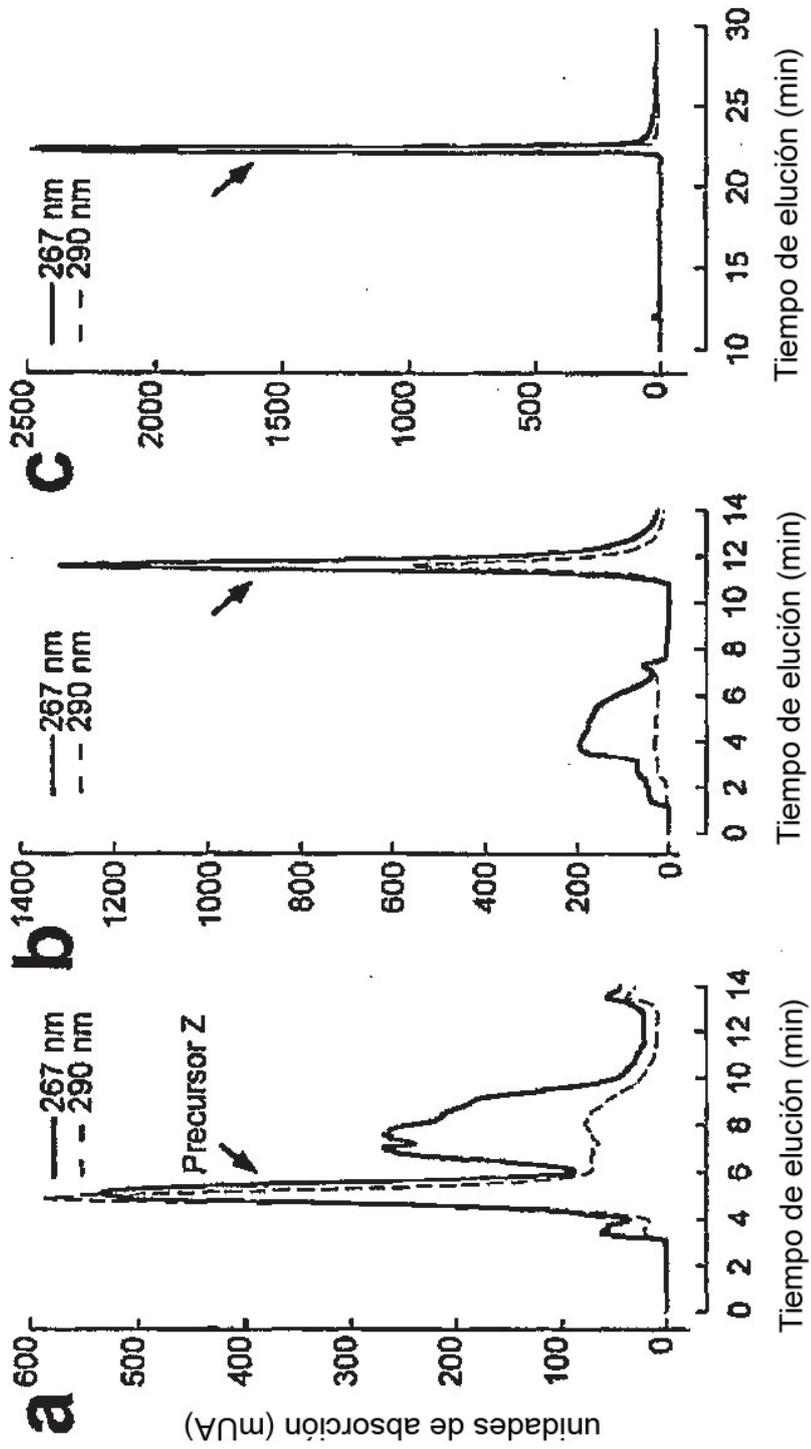


Fig. 4

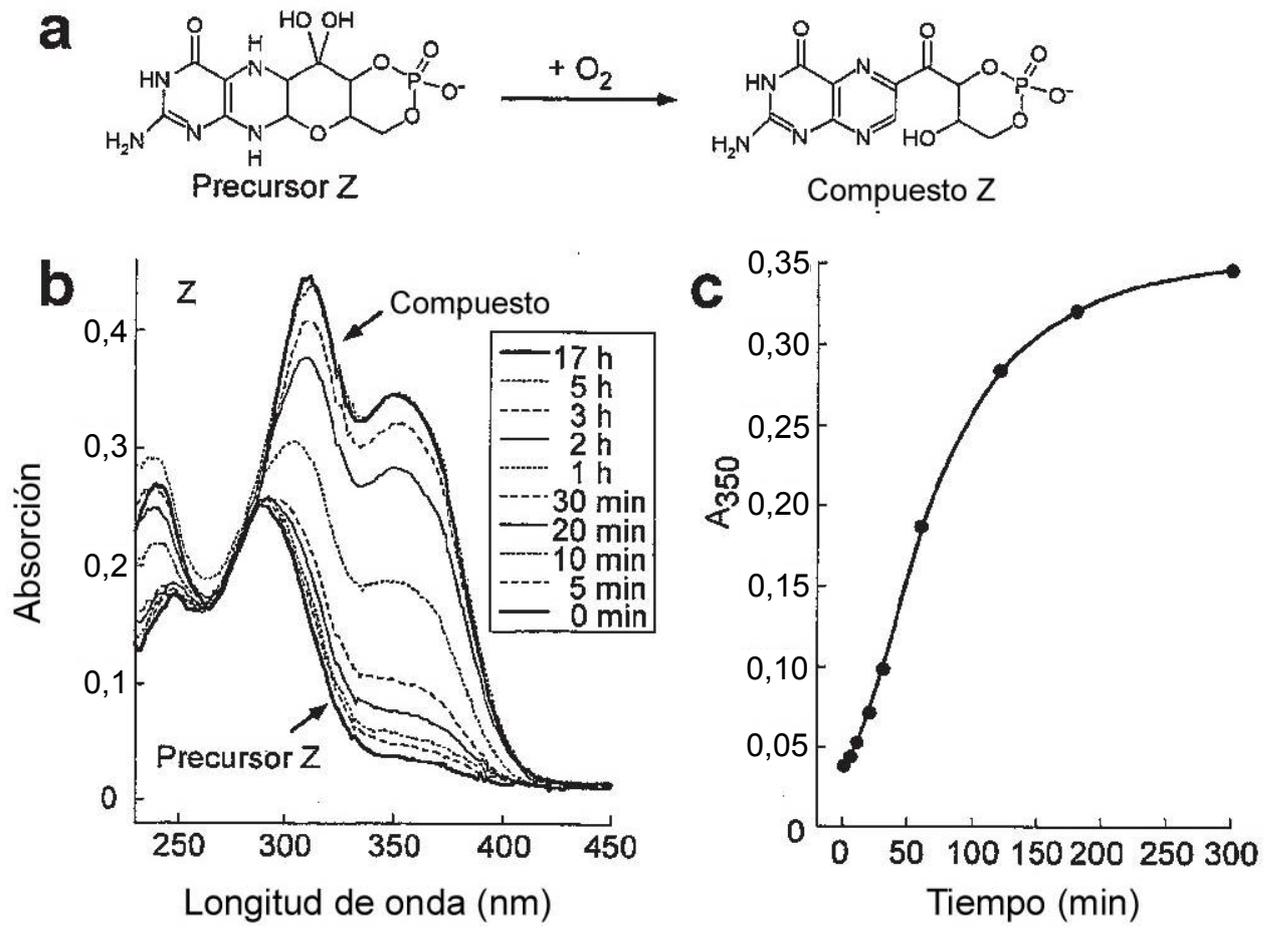


Fig. 5

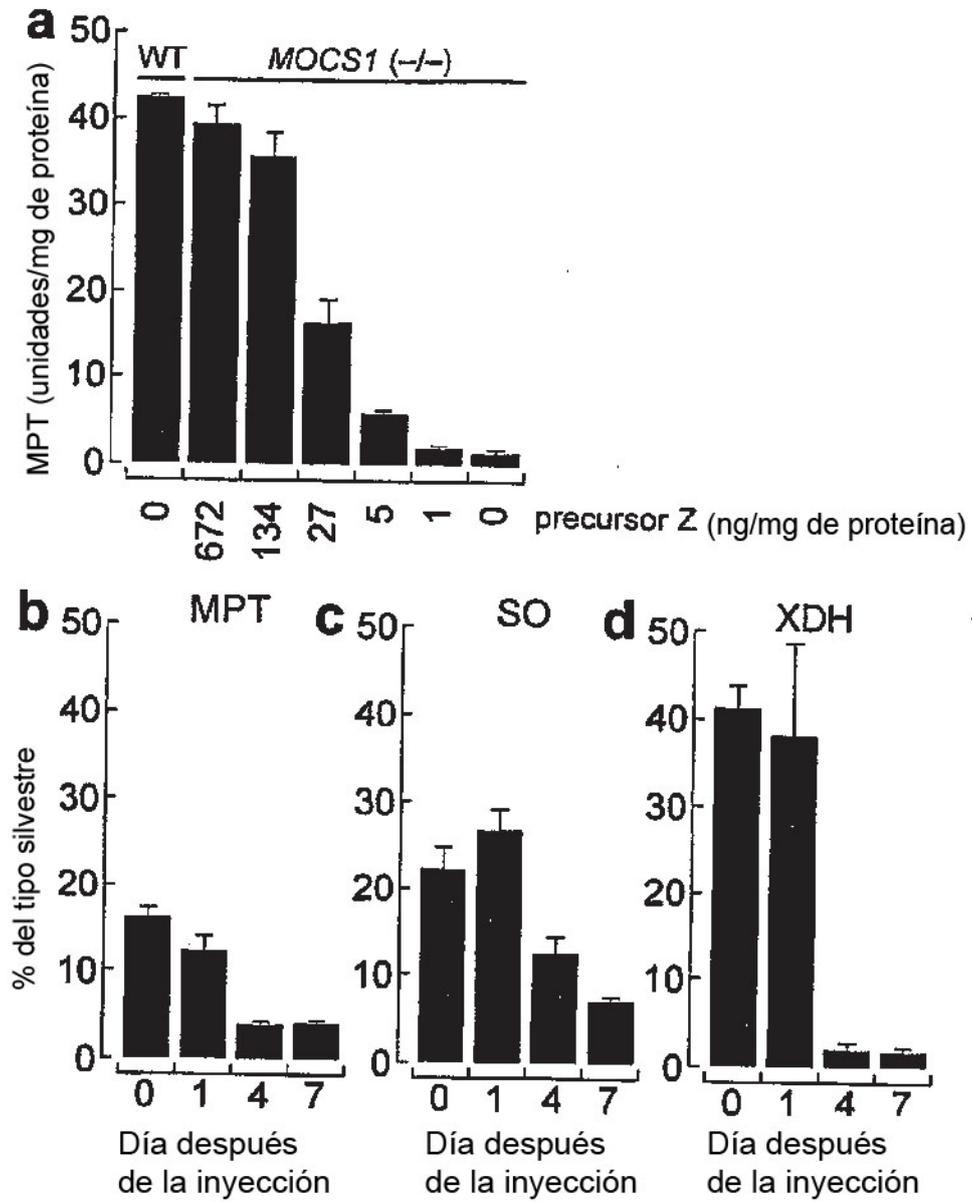


Fig. 6

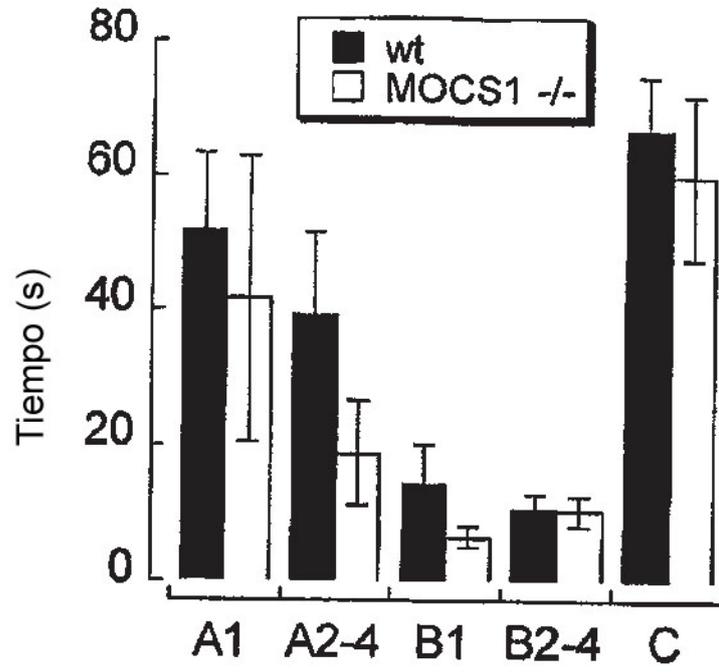


Fig. 7

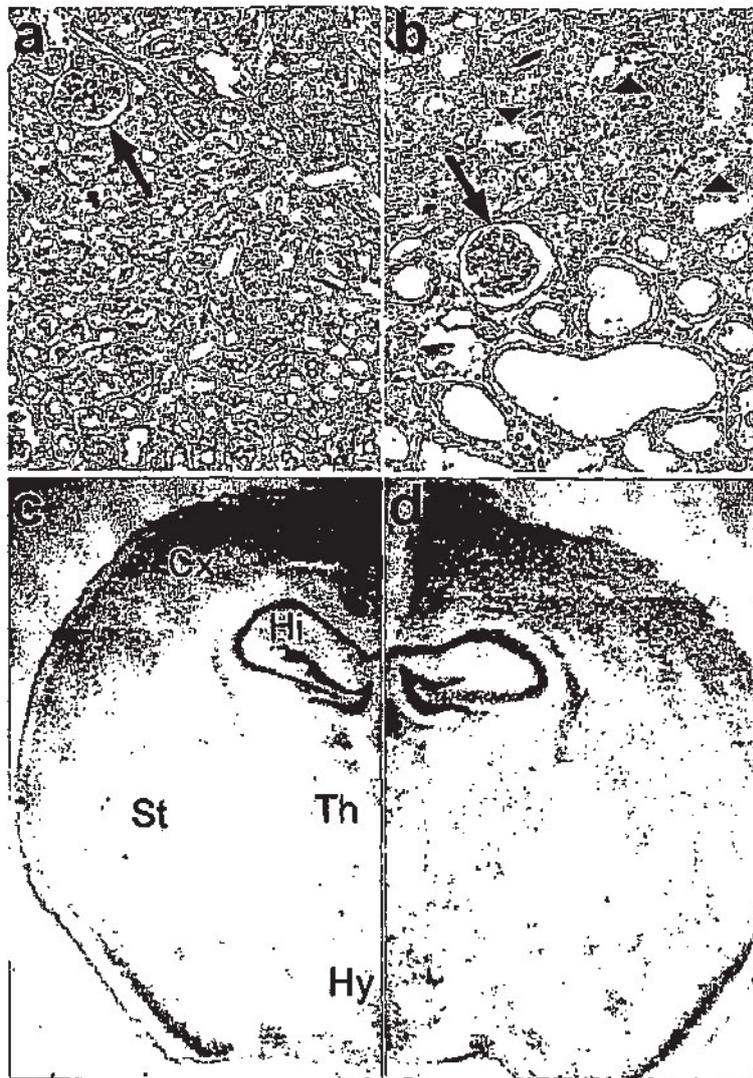


Fig. 8