

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 997**

21 Número de solicitud: 201200390

51 Int. Cl.:

**C12N 11/10** (2006.01)

**C12P 19/38** (2006.01)

22

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**13.04.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**18.10.2013**

Fecha de la concesión:

**06.02.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**13.02.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(100.0%)**

**Avda. Séneca, 2  
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ LUCAS, Jesús;  
EXÓSITO HARRIS, Ruth;  
DE LA MATA RIESCO, Isabel;  
ACEBAL SARABIA, Carmen y  
MATA CASAR, Iria**

74 Agente/Representante:

**PLUMET ORTEGA, Joaquín**

54 Título: **Biocatalizador con actividad nucleósido desoxirribosiltransferasa inmovilizado sobre partículas magnéticas de quitosano**

57 Resumen:

Biocatalizador con actividad nucleósido desoxirribosiltransferasa inmovilizado sobre partículas magnéticas de quitosano.

La invención se refiere a un nuevo biocatalizador basado en la inmovilización covalente de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus reuteri* en partículas magnéticas obtenidas a partir de quitosano y  $Fe_3O_4$  (magnetita). Asimismo, la invención se refiere al procedimiento para elaborar dicho biocatalizador y al procedimiento para utilizarlo en la síntesis de distintos nucleósidos de interés terapéutico como ara-A, ara-C, 2'-fluoro-2'-desoxiadenosina y 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

ES 2 425 997 B2

**DESCRIPCION**

Biocatalizador con actividad nucleósido desoxirribosiltransferasa inmovilizado sobre partículas magnéticas de quitosano.

**Sector de la técnica**

- 5 La presente invención se encuadra en el sector de la Biotecnología. Más concretamente, se refiere a la síntesis de nucleósidos naturales y no naturales con actividad terapéutica mediante métodos biotecnológicos. Dicha síntesis se puede realizar mediante la utilización de un nuevo biocatalizador enzimático, cuya preparación incluye la inmovilización covalente de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa en partículas magnéticas obtenidas  
10 a partir de quitosano y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetita).

**Estado de la técnica**

- Los nucleósidos modificados son moléculas de gran interés en la industria farmacéutica ya que presentan actividad antiviral y antitumoral, y pueden ser utilizados como sustratos de  
15 partida en la síntesis de oligonucleótidos antisentido [Robak T. *et al.*, Purine nucleoside analogs as immunosuppressive and antineoplastic agents: mechanism of action and, clinical activity. *Curr. Med. Chem.* **13**, 3165-3189, 2006; de Clercq E. Highlights in the discovery of antiviral drugs: a personal retrospective. *J. Med. Chem.* **53**, 1438-1450, 2010]. Los efectos adversos de los análogos de nucleósidos disponibles en la actualidad, así como  
20 la aparición de resistencias debido a su utilización prolongada, ha suscitado el interés por el desarrollo de nuevos análogos de nucleósidos con propiedades terapéuticas mejoradas. Estos análogos tradicionalmente se han sintetizado mediante métodos químicos que suponen con frecuencia muchas etapas de protección y desprotección de grupos funcionales, tanto en la base como en el azúcar del nucleósido natural de partida. En este  
25 sentido, cualquier proceso enzimático de síntesis de dichos análogos de nucleósidos es una alternativa interesante al proceso químico descrito, ya que supondría una tecnología respetuosa con el medio ambiente, utilizando enzimas como biocatalizadores con una elevada enantioespecificidad y regioselectividad en condiciones muy suaves de reacción [Lewkowicz E.S., Iribarren A.M., Nucleoside phosphorylases. *Curr. Org. Chem.* **10**, 1197-  
30 1215, 2006; Li N. *et al.*, Biocatalytic transformation of nucleoside derivatives. *Biotechnol. Adv.* **28**, 348-366, 2010; Mikhailopulo I.A. Biotechnology of nucleic acid constituents: state of the art and perspectives. *Curr. Org. Chem.* **11**, 317-333, 2007]. Para la síntesis enzimática de nucleósidos se pueden utilizar nucleósido fosforilasas o nucleósido

desoxirribosiltransferasas, enzimas procedentes de microorganismos que catalizan la reacción de transferencia de residuos glicosilados a bases nitrogenadasceptoras. A diferencia de las nucleósido fosforilasas, las nucleósido desoxirribosiltransferasas (EC 2.4.2.6) presentan como ventaja su capacidad de catalizar, en el mismo proceso 5 enzimático, la ruptura del enlace glucosídico de un desoxirribonucleósido y la posterior transferencia del resto glicosilado a una base púrica o pirimidínica que actúa como aceptor. Dicha reacción enzimática es regioselectiva (ya que la transferencia ocurre en la posición N-1 de la base pirimidínica o en la posición N-9 de la base púrica) y enantioselectiva (ya que sólo se sintetizan los anómeros con conformación  $\beta$ ). A diferencia de las purina 10 desoxirribosiltransferasas (PDTs) que catalizan exclusivamente la transferencia de la 2'-desoxirribosa entre bases púricas, las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas (NDTs) son capaces de catalizar dicha transferencia entre bases púricas y/o pirimidínicas [Kaminsiki P.A. Functional cloning, heterologous expression, and purification of two different N-deoxyribosyltransferases from *Lactobacillus helveticus*. J. Biol. Chem. **277**, 14400-14407, 15 2002]. Desde un punto de vista industrial, las transglicosilaciones en un solo paso catalizadas por las NDTs son más ventajosas que las basadas en la utilización de fosforilasas microbianas ya que, estas últimas, requieren la participación de una purina nucleósido fosforilasa y una pirimidina nucleósido fosforilasa [Lewkowicz E.S., Iribarren A.M., Nucleoside phosphorylases. Curr. Org. Chem. **10**, 1197-1215, 2006]. Las principales 20 NDTs bacterianas descritas para estos procesos proceden de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus leichmannii* [Kaminsiki P.A. *et al.*, *In vivo* reshaping the catalytic site of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase for dideoxy- and didehydronucleosides via a single amino acid substitution J. Biol. Chem. **283**, 20053-20059, 2008], *Lactobacillus helveticus* [Kaminsiki P.A. Functional cloning, heterologous expression, and purification of two 25 different N-deoxyribosyltransferases from *Lactobacillus helveticus*. J. Biol. Chem. **277**, 14400-14407, 2002], *Lactobacillus reuteri* [Fernández-Lucas J. *et al.*, *Lactobacillus reuteri* 2'-deoxyribosyltransferase, a novel biocatalyst for tailoring of nucleosides. Appl. Environ. Microbiol. **76**, 1462-1470, 2010], y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [Miyamoto *et al.*, Characterization of N-deoxyribosyltransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. 30 Biochim. Biophys. Acta **1774**, 1323-1330, 2007].

La clonación e hiperexpresión del gen *ndt* que codifica la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus reuteri* ha permitido la caracterización funcional

y estructural de la enzima soluble, así como poner de manifiesto su potencial como biocatalizador en la síntesis de diferentes nucleósidos naturales y no naturales de interés terapéutico. Además, esta nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa presenta una actividad inesperada para este tipo de enzimas, que consiste en su capacidad para sintetizar arabinonucleósidos, capacidad que no comparte con las otras enzimas nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa conocidas [Fernández-Lucas J. *et al.*, *Lactobacillus reuteri* 2'-deoxyribosyltransferase, a novel biocatalyst for tailoring of nucleosides. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 1462-1470, 2010]. Sin embargo, la inmovilización de la NDT de *L. reuteri* es un requisito previo fundamental para que un posible proceso industrial de síntesis enzimática de nucleósidos sea factible económicamente ya que permitiría su reutilización en múltiples ciclos así como su estabilización en un amplio rango de condiciones experimentales. En la literatura científica sólo aparecen descritos dos biocatalizadores inmovilizados a partir de nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas. El primero está preparado a partir de la enzima nativa y semipurificada de *Lactobacillus leichmannii* inmovilizada sobre un copolímero sintético [Hicks N., Hutchinson D.W. Synthesis of nucleoside analogs using immobilized N-deoxyribosyltransferases. *Biocatalysis* **11**, 1-7, 1994] y, como ya se ha comentado, no presenta actividad arabinosiltransferasa, mientras que el segundo está preparado con la enzima recombinante pura de *L. reuteri* unida covalentemente al soporte comercial Sepabeads® [Fernández-Lucas J. *et al.*, Enzymatic synthesis of nucleoside analogues using immobilized 2'-deoxyribosyltransferase from *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 317-327, 2011]. En este segundo caso, al ser inmovilizada, la enzima pierde su capacidad para sintetizar arabinosil-nucleósidos, y los autores del trabajo especulan sobre la posibilidad de que esa pérdida de actividad se deba a la unión de tipo covalente que tiene lugar para la inmovilización.

25

### **Explicación de la invención**

La presente invención se refiere a un biocatalizador que comprende la enzima nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa inmovilizada en un soporte biodegradable que incluye partículas magnéticas obtenidas a partir de quitosano y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetita). En la inmovilización de enzimas, los soportes biodegradables presentan la ventaja de ser menos contaminantes que los soportes sintéticos. Esta característica, unida al hecho de que la reacción catalizada por la enzima inmovilizada transcurre en condiciones suaves y en

30

medio acuoso de reacción, permite la obtención de nucleósidos de interés terapéutico a través de un proceso biosostenible. En una realización de la invención la enzima es de origen procariota y, preferentemente, es la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus reuteri* (LrNDT), caracterizada por SEQ ID NO: 2. La invención también incluye biocatalizadores que tienen inmovilizados polipéptidos con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2 y que conservan la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa. Se entiende por "porcentaje de identidad" de la secuencia aminoacídica el porcentaje de coincidencias de los mismos aminoácidos entre dos secuencias alineadas, a lo largo de la longitud completa de ambas secuencias.

10

La enzima nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa se puede obtener recombinante mediante la expresión del gen *ndt* de *L. reuteri*, caracterizado por SEQ ID NO: 1, en una bacteria fácilmente manipulable como, por ejemplo, *Escherichia coli*. La enzima recombinante se puede obtener, así mismo, partiendo de secuencias con, al menos, un 70% de identidad con el gen *ndt*, cuya expresión da lugar a polipéptidos que conservan la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa, entendiéndose por "porcentaje de identidad" de la secuencia el porcentaje de coincidencias de los mismos nucleótidos entre dos secuencias alineadas, a lo largo de toda la longitud de ambas secuencias.

15

20

Así mismo, la presente invención se refiere al procedimiento de preparación de dicho biocatalizador. El gen *ndt* de *L. reuteri*, caracterizado por SEQ ID NO: 1, que codifica la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa, caracterizada por SEQ ID NO: 2, o secuencias nucleotídicas con, al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 y cuya expresión da lugar a polipéptidos que conservan la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa, se pueden clonar en un vehículo de expresión procariota que, insertado en una bacteria de fácil manipulación en el laboratorio, como *Escherichia coli*, permite la hiperexpresión y purificación a homogeneidad de la proteína. Una vez purificada la proteína, se une a partículas magnéticas que comprenden magnetita atrapada en quitosano. Este tipo de partículas magnéticas ha sido utilizado para la inmovilización de determinadas enzimas y para su posterior utilización como biocatalizadores (CN101748113A, CN1904043A, CN101270352A). La obtención de las partículas magnéticas para la inmovilización enzimática se divide en tres fases, explicadas con más detalle en los ejemplos:

25

30

(a) el atrapamiento de la magnetita en la matriz polimérica del quitosano. Para ello, se prepara una solución de quitosano (1-3%) en ácido acético diluido (0,5-3%), en la que se dispersa homogéneamente una cantidad variable de magnetita que puede estar comprendida entre el 25% y el 50% con respecto al quitosano. La suspensión resultante se  
5 añade mediante goteo sobre una solución de NaOH permitiendo la obtención de unas primeras partículas que se mantienen en agitación durante 0,5-3 horas en la mencionada solución de sosa.

(b) el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas del quitosano, lo que permite una estabilización de las partículas y el mantenimiento permanente de la magnetita atrapada en  
10 el quitosano. Este proceso se consigue mediante incubación de las partículas de la fase anterior, una vez lavadas con agua destilada, en una solución que incluya un agente entrecruzante. Dicho agente entrecruzante puede ser, por ejemplo, epíclorhidrina (2-5% a 50°C) o glutaraldehído (0,0025-2,5%, a 25°C).

(c) la activación de las partículas magnéticas, que favorece la formación de enlaces  
15 covalentes de tipo base de Schiff con los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas situadas en la superficie de la enzima. Para ello, se incuban las partículas de la etapa anterior, y lavadas con agua destilada, en una solución tamponada de glutaraldehído (al 2,5% preferentemente) a 25°C. Si el quitosano ha sido entrecruzado con glutaraldehído al 1-2,5% en la fase anterior, no es necesaria esta etapa ya que el soporte se encontraría ya activado.

20 Para obtener el biocatalizador inmovilizado, se realiza un cuarto paso:

(d) la unión de la enzima nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa. Se consigue poniendo en contacto la enzima purificada con las partículas magnéticas de quitosano funcionalizadas con grupos aldehído. Para ello, una cantidad variable de enzima (11-70  $\mu$ g) se pone en contacto con las partículas magnéticas (17-50 mg) en un tampón fosfato de pH 7,0 durante  
25 2-5 horas a temperatura ambiente.

Tal y como aparece descrito en los ejemplos de la presente memoria descriptiva, el biocatalizador obtenido es eficaz en la síntesis de distintos nucleósidos naturales y no naturales y, dentro de estos últimos, arabinosil-nucleósidos como el arabinósido de adenina  
30 (ara-A) y arabinósido de citosina (ara-C), así como diferentes 2'-fluoro-2'-desoxiribonucleósidos como la 2'-fluoro-2'-desoxiadenosina y la 2'-fluoro-2'-

desoxicitidina (Figura 1). El arabinósido de adenina (ara-A), también conocido como vidarabina, es un fármaco indicado en el tratamiento de la queratoconjuntivitis aguda y queratitis epitelial recurrente causada por los virus del herpes simple tipos 1 y 2 [Superti, M.G. *et al.* New advances in anti-HSV chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **15**, 900–911, 2008].

El ara-A obtenido sirve, además, como intermediario en la síntesis de la fludarabina (2F-ara-A) y su fosfato (Fludara<sup>®</sup>), análogo utilizado como fármaco antineoplásico en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica y en terapias de rescate para linfoma no Hodgkin y leucemias agudas [Robak T. *et al.*, Purine nucleoside analogs as immunosuppressive and antineoplastic agents: mechanism of action and, clinical activity. *Curr. Med. Chem.* **13**, 3165-3189, 2006]. A partir de ara-A se puede obtener otro arabinosil-nucleósido de interés como la clofarabina (2-cloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxiadenosina, CAFdA, Cl-F-ara-A), recientemente aprobado para tratar leucemias en pacientes pediátricos (Clolar<sup>®</sup>, Evolta<sup>®</sup>) [Zhenchuk A. *et al.* Mechanisms of anti-cancer action and pharmacology of clofarabine. *Biochem Pharmacol* **78**, 1351–1359, 2009]. En cuanto al arabinósido de citosina (ara-C), conocido como citarabina, ha sido el agente terapéutico utilizado desde finales de la década de 1950 para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda [Robak T, Wierbowska A. Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. *Clin. Ther.* **31**, 2349–2370, 2009]. Otro de los compuestos sintetizados por la enzima inmovilizada es la 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, nucleósido sintético que exhibe una actividad antiviral muy potente frente a la replicación del virus Borna, sin presentar prácticamente citotoxicidad [Bajramovic J.J. *et al.* 2'-Fluoro-2'-deoxycytidine inhibits Borna disease virus replication and spread. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1422-1425, 2004].

25

Otro aspecto de la invención, por lo tanto, se refiere al método para sintetizar nucleósidos naturales y/o no naturales mediante la utilización del biocatalizador inmovilizado de la presente invención a través de una reacción enzimática de transferencia, entre un nucleósido donador de residuos glicosilados (que contiene una base púrica y/o pirimidínica) y una base nitrogenada aceptora de residuos glicosilados. De este modo, y empleando dicho biocatalizador, se puede sintetizar enzimáticamente en un solo paso nucleósidos como los que se indican a continuación (Figura 1): 2'-desoxiadenosina a partir

30

de 2'-desoxiuridina y adenina, ara-C a partir de ara-U y citosina, ara-A a partir de ara-U y adenina, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina a partir de 2'-fluoro-2'-desoxiuridina y citosina, y 2'-fluoro-2'-adenosina a partir de 2'-fluoro-2'-desoxiuridina y adenina. La síntesis de dichos compuestos se describe con mayor detalle en los ejemplos que se dan posteriormente. El biocatalizador permite realizar dichas reacciones de transferencia a distintas temperaturas (20-80° C) y diferentes valores de pH (4,5-8,5), y con agitación de tipo orbital o magnética. En una realización preferida de la invención, las condiciones que se utilizan son 40°C y pH 6,5 en las cuales la enzima inmovilizada presenta una mayor termoestabilidad. Tras completar la reacción de transferencia, la separación del biocatalizador es sencilla (por ejemplo, mediante filtración, aplicación de un campo magnético, decantación o centrifugación), y permite que el mismo biocatalizador se reutilice en ciclos sucesivos de reacción.

#### Breve descripción de los dibujos

**Figura 1.** Estructuras químicas de varios nucleósidos no naturales descritos en la presente patente.

**Figura 2.** Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la *Lr*NDT inmovilizada en partículas magnéticas de quitosano. Se midió la actividad estándar del biocatalizador inmovilizado a las diferentes temperaturas indicadas.

**Figura 3.** Desactivación térmica de la *Lr*NDT inmovilizada en partículas magnéticas de quitosano a 40 °C (○) y 60 °C (●). Se midió la actividad estándar del biocatalizador inmovilizado después de su incubación en tampón MES pH 6,5 a los distintos tiempos de incubación y temperaturas indicados.

#### Modo de realización de la invención

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

#### Ejemplo 1. Producción y purificación de la enzima *Lr*NDT

La enzima se produjo y se purificó a homogeneidad siguiendo el protocolo descrito por Fernández-Lucas *et al.* [Fernández-Lucas J. *et al.*, *Lactobacillus reuteri* 2'-deoxyribosyltransferase, a novel biocatalyst for tailoring of nucleosides. Appl. Environ.

Microbiol. **76**, 1462-1470, 2010] y utilizando para ello la cepa de *E. coli* CECT 7435, que contiene el plásmido pT28*ndt*, que produce la proteína con actividad enzimática nucleótido 2'-desoxirribosiltransferasa recombinante de *Lactobacillus reuteri* (LrNDT), caracterizada por SEQ ID NO: 2 [Fernández-Lucas J. *et al.*, *Lactobacillus reuteri* 2'-deoxyribosyltransferase, a novel biocatalyst for tailoring of nucleosides. Appl. Environ. Microbiol. **76**, 1462-1470, 2010]. Para ello, *E. coli* CECT 7435 se incubó a 37°C en medio líquido LB al que se había añadido kanamicina (50 µg/l). Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,8 a 600nm (DO<sub>600</sub>), se indujo la expresión del gen *ndt* mediante la adición de 0,4 mM IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido) y se mantuvo durante 2,5 horas. A continuación, se recogieron las células por centrifugación a 3500 xg durante 15 minutos, se resuspendieron en tampón fosfato potásico 10mM, pH 7 (tampón A) y se lisaron mediante sonicación. La proteína se purificó por cromatografía utilizando cartuchos Econo-Pac High Q (Bio-Rad) equilibrados con tampón A. La columna se lavó con el mismo tampón A y la proteína se eluyó en un gradiente lineal de 0 a 0,5 M NaCl en tampón A. Se juntaron las fracciones que contenían la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa realizando el correspondiente perfil cromatográfico de proteína a 280 nm, junto con un control electroforético en geles de poliacrilamida al 12,5% en presencia de SDS (SDS-PAGE) [Laemmli U.K. Claveage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685, 1970] para comprobar que cada una de las fracciones seleccionadas contenía la enzima parcialmente purificada. Una vez juntadas las fracciones, y comprobada la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa, se concentraron empleando polietilen glicol 35000 (Sigma), para realizar posteriormente una cromatografía de penetrabilidad en una columna Superose 12 Fast Flow (Amersham Biosciences), equilibrada con tampón fosfato potásico 50mM a pH 7 (tampón B). Se realizó el correspondiente perfil cromatográfico de proteína a 280 nm, junto con un control electroforético, para comprobar que cada una de las fracciones seleccionadas contenía la enzima pura a homogeneidad. Finalmente, las fracciones que contenían la enzima pura se juntaron en un mismo volumen final, y se comprobó la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de dicho volumen, así como su concentración de proteína mediante el método colorimétrico de Bradford [Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248-252, 1976].

**Ejemplo 2.** Producción de las partículas magnéticas

Las partículas magnéticas se obtuvieron a partir de un quitosano suministrado por la casa comercial Primex (Islandia) con un peso molecular de 644 kDa y un grado de desacetilación del 90%, y magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) suministrada por la casa Sigma. La

5 preparación de las partículas magnéticas de quitosano, y su posterior activación con el fin de favorecer la unión covalente de la enzima, se detallan a continuación. A 10 mL de solución de quitosano al 3% (*p/v*) en ácido acético al 2% (*v/v*), se le añadieron 150 mg de magnetita (50% *p/p* respecto al polímero), y posteriormente se dejó agitar a temperatura ambiente hasta que se consiguió la dispersión total de la magnetita en la solución de

10 quitosano. A continuación, se añadieron 3 mL de la suspensión resultante mediante goteo a una solución de NaOH 2M (50 mL). Las partículas formadas (de aproximadamente 1.5 mm de diámetro) se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, las partículas se recogieron mediante filtrado en placa de vidrio poroso y se lavaron dos veces con 50 mL de agua destilada sobre la misma placa. A

15 continuación, se procedió al reticulado del quitosano con el fin de aumentar su estabilidad física y química. Para ello, se dispusieron 2,5 g de partículas en 25 mL de una solución de epíclorhidrina (Sigma) al 2% (*v/v*) disuelta en NaOH 1M. Transcurridas 2 horas de incubación a 50°C y 200 r.p.m. de agitación en la solución de epíclorhidrina, las partículas reticuladas se filtraron en placa de vidrio poroso y posteriormente se incubaron en 50 mL

20 de etanol frío (80% *v/v*) durante 30 minutos a 4° C con el fin de eliminar restos de epíclorhidrina. Tras retirar el etanol, se procedió a lavar las partículas magnéticas con 50 mL de agua destilada sobre la placa de vidrio poroso con el fin de eliminar los restos de alcohol y otras impurezas. Una vez preparadas, las partículas se activaron con glutaraldehído de tal manera que uno de sus dos grupos aldehído se unió a los grupos

25 amino del quitosano, mientras que el otro quedó libre para unir mediante enlace covalente moléculas de enzima a través de sus grupos  $\epsilon$ -amino de la cadena lateral de los restos de lisina presentes en su superficie. Dicha activación se realizó de la siguiente manera: 1 g de partículas magnéticas de quitosano se sumergió en 4 mL de una solución de glutaraldehído (Sigma) al 2,5% (*v/v*) en tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7,0, y se dejó en agitación en

30 dicha solución durante 2 horas a 25°C. Una vez transcurrido este tiempo de activación, las partículas se filtraron sobre placa de vidrio poroso y se lavaron tres veces con 10 mL de agua destilada sobre la misma placa con el fin de eliminar restos de glutaraldehído.

**Ejemplo 3.** Inmovilización de la enzima *Lr*NDT en las partículas magnéticas de quitosano

Se utilizaron las partículas magnéticas de quitosano obtenidas en el ejemplo 2 para la inmovilización de la *Lr*NDT purificada como se describe en el ejemplo 1. En este sentido, se adicionaron 50 mg de partículas magnéticas de quitosano a 170  $\mu$ L de una solución de *Lr*NDT (0,4 mg/mL) en tampón fosfato potásico 100 mM pH 7,0 y se mantuvieron en 5  
agitación orbital de 350 r.p.m. durante 5 horas a 25°C. Finalmente, las partículas se lavaron 5 veces con 500  $\mu$ l de tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,0, retirando el volumen de lavado después de 5 minutos de contacto. En estas condiciones de inmovilización, se consiguió unir prácticamente toda la enzima al soporte, hecho que se determinó al 10  
comprobar que la enzima estaba ausente en los tampones de filtrado y lavado. La eficacia de unión de la enzima *Lr*NDT al soporte se determinó valorando la presencia de proteína mediante el método de Bradford [Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-252, 1976] en cada uno de los tampones de filtrado y 15  
lavado utilizados. Finalmente, el biocatalizador obtenido se puede mantener a 4°C hasta su utilización en la síntesis de los distintos nucleósidos.

**Ejemplo 4.** Preparación de diferentes nucleósidos catalizada por la enzima *Lr*NDT inmovilizada en partículas magnéticas de quitosano.

A continuación, se incluyen varios ejemplos del procedimiento para la síntesis de 20  
diferentes nucleósidos mediante el empleo como biocatalizador de la *Lr*NDT inmovilizada en las partículas magnéticas de quitosano. En los diferentes ejemplos que se presentan, los productos de reacción se pueden cuantificar mediante HPLC utilizando las siguientes condiciones: columna ACE 5 C18-PFP (250  $\times$  4,6 mm); fase móvil: (1) gradiente lineal 25  
durante 10 minutos de acetato de trimetilamonio 0.1 M hasta alcanzar 90/10 (v/v) acetato de trimetilamonio 0.1 M /acetonitrilo, (2) 10 minutos con 90/10 (v/v) acetato de trimetilamonio 0.1 M /acetonitrilo. El flujo se fija a 1 ml/min (180 bares de presión) y el detector UV se ajusta a 260 nm. En estas condiciones, los tiempos de retención de las bases y nucleósidos detectados son: adenina (Ade), 10.14 min; uracilo (Ura), 5.41 min; citosina 30  
(Cyt), 4.14 min; 2'-desoxiadenosina (dAdo), 15.50 min; 2'-desoxiuridina (dUrd), 9.16 min; 2'-desoxicitidina (dCyd), 8.22 min; 2'-fluoro-2'-desoxiuridina (2'-FdUrd), 10.3 min; 2'-fluoro-2'-desoxiadenosina (2'-FdAde): 16.07 min; 2'-fluoro-2'-desoxicitidina (2'-FdCyd),

8.7 min; ara-Uracilo (ara U), 8.68; ara-Adenina (ara-A): 13.9 min; ara-Citosina (ara-C): 7.78 min.

#### Síntesis de 2'-desoxiadenosina (medida de actividad estándar)

5 Antes de utilizar el biocatalizador para la síntesis de otros nucleósidos no naturales, se determinó su actividad en una reacción estándar de síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuridina y adenina. Para ello, se añadieron 17 mg de biocatalizador inmovilizado (que contenían 11.7  $\mu\text{g}$  de *Lr*NDT inmovilizada) a 174  $\mu\text{L}$  de una solución de 2'-desoxiuridina 16 mM y adenina 16 mM en tampón MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico) 50 mM pH 6.5. La reacción se mantuvo en agitación a 40°C y 350 r.p.m. 10 durante 10 minutos. Una vez finalizado el tiempo de reacción, se tomó un alícuota de 50  $\mu\text{L}$  del medio de reacción a la cual se añadió 50  $\mu\text{L}$  de etanol frío a 4°C. La mezcla se calentó a 95°C durante 5 minutos y, tras su posterior centrifugación a 9.000 $\times$ g durante 2 minutos, se procedió a analizar cuantitativamente los productos de síntesis (2'- 15 desoxiadenosina y uracilo), localizados en el sobrenadante, mediante HPLC. En estas condiciones de reacción, una unidad internacional de actividad (UI) se define como la cantidad de biocatalizador que produce 1  $\mu\text{mol}$  de 2'-desoxiadenosina por minuto. Atendiendo a lo indicado anteriormente, la enzima inmovilizada poseía una actividad de 3.14 UI/g de biocatalizador. Empleando la misma reacción estándar, se determinó la 20 temperatura a la cual la enzima inmovilizada presenta una mayor actividad. De esta manera, la *Lr*NDT inmovilizada en las partículas de quitosano magnético presenta una actividad máxima a 60°C y pH 6.5 (4.57 UI/g, Figura 2), veinte grados superior a la que presenta la enzima soluble [que se describe en J. Fernández-Lucas *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 76, 1462 (2010)]. Este aumento en la estabilidad térmica de la enzima debido a 25 la inmovilización, se comprobó también mediante la incubación a 40°C y 60°C del biocatalizador a diferentes tiempos de almacenamiento y posterior medida de su actividad residual mediante la reacción estándar. De esta manera, se constató que la enzima inmovilizada mantiene el 100% de su actividad después de su almacenamiento en un 30 tampón fosfato 10 mM pH 7.0 a 40°C durante al menos 148 horas, mientras que a 60°C pierde el 50% de actividad al cabo de 60 horas de incubación (Figura 3). Finalmente, se comprobó que el biocatalizador inmovilizado se puede utilizar en sucesivas reacciones estándar durante al menos 40 ciclos, conservando el 100% de la actividad detectada en el primer ciclo de actividad.

Síntesis de ara-C

Para la síntesis de ara-C se procedió de la siguiente manera: se añadieron 32 mg de biocatalizador inmovilizado (con una actividad de 3.14 UI/g en la reacción estándar) a 350  
5  $\mu$ L de una solución de ara-U 0.5 mM y citosina 0.5 mM en tampón MES 50 mM pH 6.5. La reacción se mantuvo en agitación a 40°C y 350 r.p.m. en un intervalo comprendido entre 0 y 96 horas, alcanzando un rendimiento máximo del 17% a las 72 horas.

Síntesis de ara-A

10 Para la síntesis de ara-A se procedió de la siguiente manera: se añadieron 32 mg de biocatalizador inmovilizado (con una actividad de 3.14 UI/g en la reacción estándar) a 350  $\mu$ L de una solución de ara-U 0.5 mM y adenina 0.5 mM en tampón MES 50 mM pH 6.5. La reacción se mantuvo en agitación a 40°C y 350 r.p.m. en un intervalo comprendido entre 0 y 96 horas, alcanzando un rendimiento máximo del 14% a las 72 horas.

15

Síntesis de 2'-fluoro-2'-desoxicitidina

Para la síntesis de 2'-fluoro-2'-desoxicitidina se procedió de la siguiente manera: se añadieron 32 mg de biocatalizador inmovilizado (con una actividad de 3.14 UI/g en la reacción estándar) a 350  $\mu$ L de una solución de 2'-fluoro-2'-desoxiuridina 0.5 mM y  
20 citosina 0.5 mM en tampón MES 50 mM pH 6.5. La reacción se mantuvo en agitación a 40°C y 350 r.p.m. en un intervalo comprendido entre 0 y 72 horas, alcanzando un rendimiento máximo del 67% a las 24 horas.

Síntesis de 2'-fluoro-2'-desoxiadenosina

25 Para la síntesis de 2'-fluoro-2'-desoxiadenosina se procedió de la siguiente manera: se añadieron 32 mg de biocatalizador inmovilizado (con una actividad de 3.14 UI/g en la reacción estándar) a 350  $\mu$ L de una solución de 2'-fluoro-2'-desoxiuridina 0.5 mM y adenina 0.5 mM en tampón MES 50 mM pH 6.5. La reacción se mantuvo en agitación a 40°C y 350 r.p.m. en un intervalo comprendido entre 0 y 72 horas, alcanzando un  
30 rendimiento máximo del 10% a las 24 horas.

**Reivindicaciones**

1. Biocatalizador inmovilizado que comprende la enzima nucleósido 2'-desoxirribosil-transferasa inmovilizada covalentemente en partículas sólidas elaboradas a partir de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) atrapada en quitosano.  
5
2. Biocatalizador inmovilizado según la reivindicación 1 en el que las partículas sólidas elaboradas a partir de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) atrapada en quitosano están activadas con glutaraldehído.  
10
3. Biocatalizador inmovilizado según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en que la nucleósido 2'-desoxirribosil-transferasa es de origen procariota.
4. Biocatalizador inmovilizado según la reivindicación 3 en que la enzima inmovilizada es la nucleósido 2'-desoxirribosil-transferasa de *Lactobacillus reuteri*, caracterizada por SEQ ID NO: 2, o un polipéptido cuya secuencia tiene, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2 y conserva su actividad nucleósido 2'-desoxirribosil-transferasa.  
15
5. Biocatalizador inmovilizado según la reivindicación 4 en que la nucleósido 2'-desoxirribosil-transferasa es una enzima recombinante.  
20
6. Biocatalizador inmovilizado según la reivindicación 5 en que la nucleósido 2'-desoxirribosil-transferasa recombinante procede de la expresión del gen *ndt* de *L. reuteri*, caracterizado por SEQ ID NO: 1, o de una secuencia con, al menos, un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, recombinante en *Escherichia coli*.  
25
7. Procedimiento para la preparación del biocatalizador inmovilizado definido en las reivindicaciones anteriores que comprende: (a) el atrapamiento de magnetita en una matriz polimérica de quitosano, (b) el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas de quitosano, (c) la activación de las partículas magnéticas, (d) la unión de la enzima nucleósido 2'-desoxirribosil-transferasa a las partículas magnéticas obtenidas en el paso (c).  
30

8. Procedimiento según la reivindicación 7 en el que el paso (a) incluye la preparación de una solución de quitosano al 3% en ácido acético en la que se dispersa homogéneamente un 25-50% de magnetita, con respecto a la cantidad de quitosano; la adición de la suspensión resultante a una solución de NaOH mediante goteo; y la agitación de las partículas obtenidas durante 0,5-3 horas en la solución de NaOH.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7-8 en que el paso (b) se realiza con epíclorhidrina al 2-5% a 50°C.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7-9 en el que el paso (c) incluye la incubación de las partículas magnéticas en una solución tamponada de glutaraldehído a 25°C.
11. Procedimiento según la reivindicación 10 en que la concentración de glutaraldehído en solución tamponada es del 2,5%.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7-11 en el que el paso (d) incluye poner en contacto 11-70  $\mu\text{g}$  de nucleósido 2'-desoxirribosil-transferasa purificada con 17-50 mg de las partículas magnéticas del paso (c).
13. Procedimiento según la reivindicación 12 en el que la nucleósido 2'-desoxirribosil-transferasa se pone en contacto con las partículas magnéticas del paso (c) a pH 7 y durante 2-5 horas a 25°C.
14. Procedimiento para la producción de nucleósidos naturales y no naturales mediante una reacción enzimática de transglicosilación en un solo paso, entre un nucleósido donador de residuos glicosilados (que contiene una base púrica y/o pirimidínica) y una base nitrogenada aceptora de residuos glicosilados, que comprende el uso del biocatalizador definido en las reivindicaciones 1-6.
15. Procedimiento según la reivindicación 14 en que el residuo glicosilado del nucleósido donador es  $\beta$ -D-arabinosa, 2'-desoxi- $\beta$ -D-ribosa o 2'-fluoro-2'-desoxi- $\beta$ -D-ribosa, y la base aceptora es citosina o adenina.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14-15 en que la reacción se realiza a 40°C.

5 17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14-16 en que la reacción se realiza a pH 6,5.

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14-17 en que, tras la conclusión de la reacción, el biocatalizador inmovilizado se separa de la mezcla de  
10 reacción mediante aplicación de un campo magnético, filtración, decantación o centrifugación, y es reutilizable en reacciones de transglicosilación sucesivas.

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14-18 en que el nucleósido producido está incluido en el siguiente grupo: 2'-desoxiadenosina; arabinosil-nucleósidos  
15 como el arabinósido de adenina (ara-A) y el arabinósido de citosina (ara-C); 2'-fluoro-2'-desoxiribonucleósidos como la 2'-fluoro-2'-desoxiadenosina y la 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

**Fig. 1**

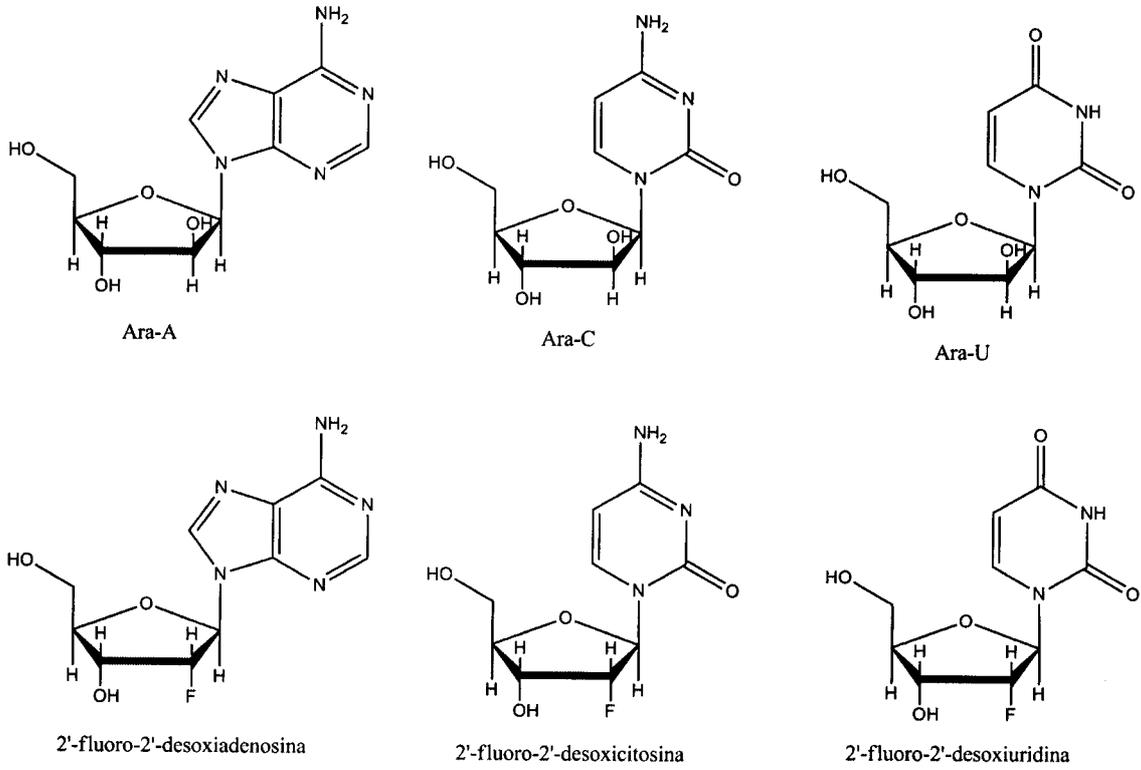


Fig. 2

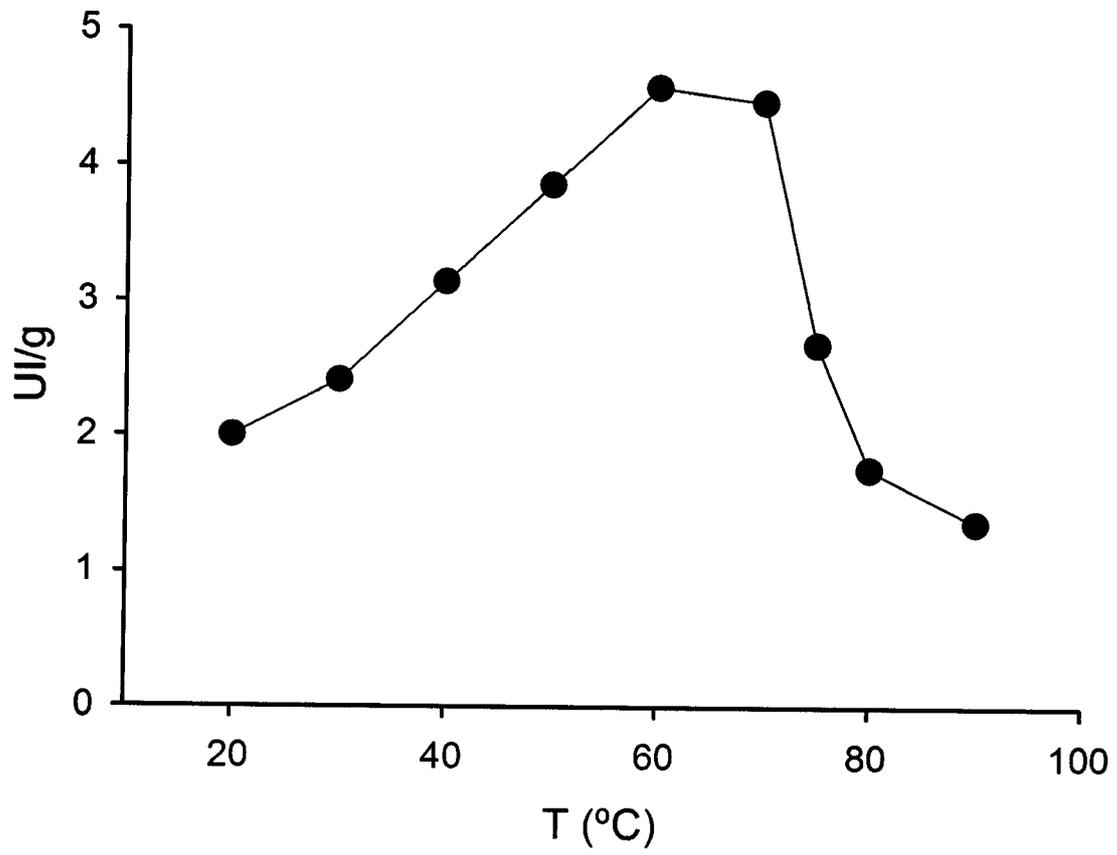
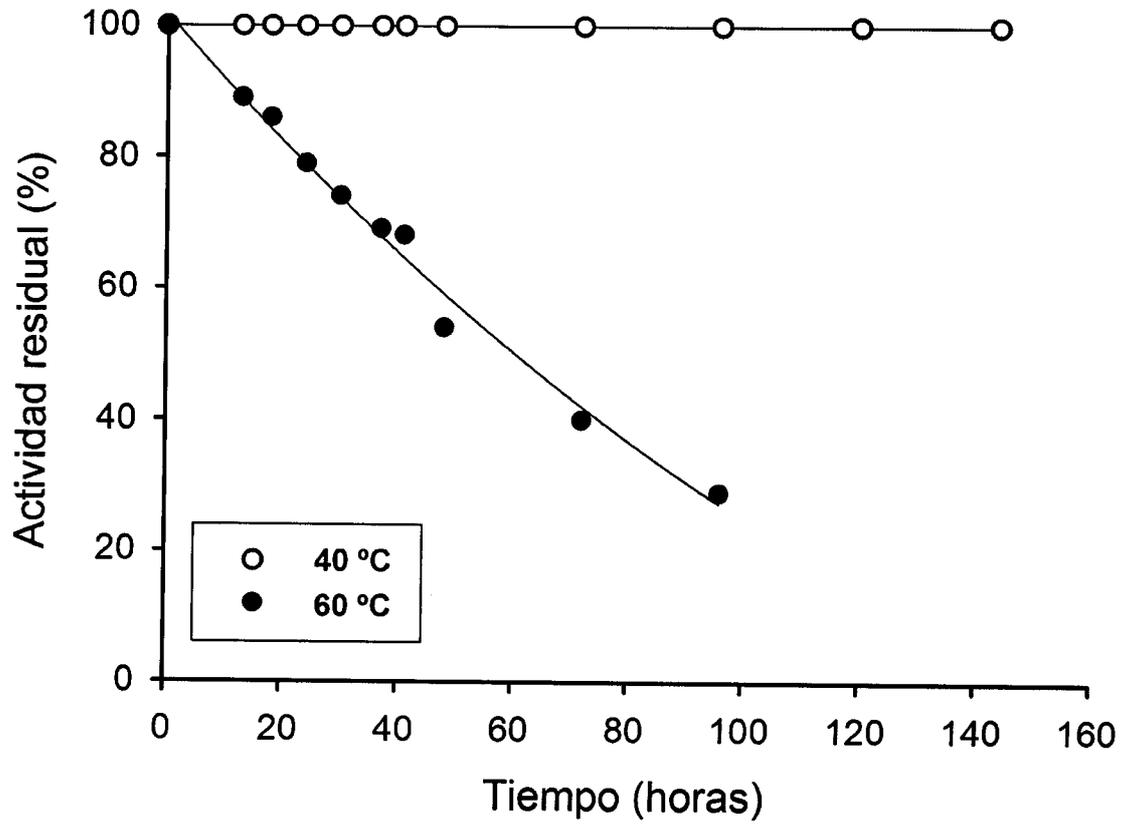


Fig. 3



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Complutense de Madrid

<120> Biocatalizador con actividad nucleósido  
desoxirribosiltransferasa inmovilizado sobre partículas magnéticas de  
quitosano

<130> 01\_2012

<160> 2

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1  
<211> 483  
<212> DNA  
<213> Lactobacillus reuteri

<220>  
<221> source  
<222> 1..483  
<223> /mol\_type="DNA"  
/organism="Lactobacillus reuteri"

<220>  
<221> CDS  
<222> 1..480  
<223> /transl\_table=11

/translation="MINQKSKTVYFCAGWFTDKQNKAYEDAMNAIKANPTVDVENSIVPLQHQYK  
GLRVDEHPPELLQDREWSTATYNGDRVGVSTSDMLLAVYIPEEEDVGMGVELGMARALGKYIMVVI  
PDEDFGKPINLMSWGIADNFIKMSLELPNDYFNKPSYNFYDGGVY"

<400> 1  
atgataaatc aaaaaagtaa gacagtatat ttctgtgccg ggtggtttac tgacaagcaa  
60  
  
aataaagctt atgaggatgc aatgaatgca attaaggcta accctacagt agatgtagag  
120  
  
aattcttatg tgccattaca acaccaatat aaaggattac gggttgatga acatccagag  
180  
  
cttttgcaag atcgcgaatg gagtacagca acttacaatg gtgatcgagt aggcgtttca  
240  
  
acttttgata tgcttttagc agtctacatt cctgaagaag aagatgtagg aatgggtggt  
300  
  
gaattaggaa tggcacgcgc actaggtaaa tatattatgg tagtgattcc tgatgaggac  
360  
  
tttggtaaac caattaattt aatgagttgg ggaattgcag ataatttcat taaaatgtca  
420  
  
gaacttctta atgattactt taataaacca tcttataatt tctacgatgg tggagtatat  
480  
  
taa  
483

<210> 2  
<211> 160

ES 2 425 997 B2

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..160

<223> /mol\_type="protein"  
 /note="[CDS]:1..480 from SEQ ID NO 1"  
 /organism="Lactobacillus reuteri"

<400> 2

```

Met Ile Asn Gln Lys Ser Lys Thr Val Tyr Phe Cys Ala Gly Trp Phe
1          5          10          15
Thr Asp Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Glu Asp Ala Met Asn Ala Ile Lys
20          25          30
Ala Asn Pro Thr Val Asp Val Glu Asn Ser Tyr Val Pro Leu Gln His
35          40          45
Gln Tyr Lys Gly Leu Arg Val Asp Glu His Pro Glu Leu Leu Gln Asp
50          55          60
Arg Glu Trp Ser Thr Ala Thr Tyr Asn Gly Asp Arg Val Gly Val Ser
65          70          75
Thr Ser Asp Met Leu Leu Ala Val Tyr Ile Pro Glu Glu Glu Asp Val
85          90          95
Gly Met Gly Val Glu Leu Gly Met Ala Arg Ala Leu Gly Lys Tyr Ile
100         105         110
Met Val Val Ile Pro Asp Glu Asp Phe Gly Lys Pro Ile Asn Leu Met
115         120         125
Ser Trp Gly Ile Ala Asp Asn Phe Ile Lys Met Ser Glu Leu Pro Asn
130         135         140
Asp Tyr Phe Asn Lys Pro Ser Tyr Asn Phe Tyr Asp Gly Gly Val Tyr
145         150         155         160
  
```



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201200390

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.04.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N11/10** (2006.01)  
**C12P19/38** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FERNANDEZ-LUCAS JESUS et al. "Enzymatic synthesis of nucleoside analogues using immobilized 2'-deoxyribosyltransferase from <i>Lactobacillus reuteri</i> ." Applied Microbiology and Biotechnology 08.04.2011 VOL: 91 No: 2 Págs: 317-327 ISSN 0175-7598 (print) - ISSN 1432-0614 (electronic) Doi: doi:10.1007/s00253-011-3221-7; todo el documento.	1-19
A	FERNANDEZ-LUCAS JESUS et al. " <i>Lactobacillus reuteri</i> 2'-Deoxyribosyltransferase, a Novel Biocatalyst for Tailoring of Nucleosides." Applied and Environmental Microbiology marzo 2010 VOL: 76 No: 5 Págs: 1462-1470 ISSN 0099-2240 (print) - ISSN 1098-5336 (electronic) Doi: doi:10.1128/AEM.01685-09; todo el documento.	1-19
A	WO 2011076894 A1 (INST UNIV DE CIENCIA I TECNOLOGIA S A et al.) 30.06.2011, todo el documento.	1-19
A	US 2007065922 A1 (BARAI VLADIMIR N et al.) 22.03.2007, todo el documento.	1-19
A	US 2007249023 A1 (ZUFFI GABRIELE et al.) 25.10.2007, todo el documento.	1-19

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  
23.04.2013

Examinador  
M. Á. García Coca

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/ELSEVIER, bases de texto completo TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.04.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-19	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-19	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FERNANDEZ-LUCAS JESUS et al. "Enzymatic synthesis of nucleoside analogues using immobilized 2'-deoxyribosyltransferase from <i>Lactobacillus reuteri</i> ." Applied Microbiology and Biotechnology 08.04.2011 VOL: 91 No: 2 Págs: 317-327 ISSN 0175-7598 (print) - ISSN 1432-0614 (electronic) Doi: doi:10.1007/s00253-011-3221-7.	30.06.2011
D02	FERNANDEZ-LUCAS JESUS et al. " <i>Lactobacillus reuteri</i> 2'-Deoxyribosyltransferase, a Novel Biocatalyst for Tailoring of Nucleosides." Applied and Environmental Microbiology marzo 2010 VOL: 76 No: 5 Págs: 1462-1470 ISSN 0099-2240 (print) - ISSN 1098-5336 (electronic) Doi: doi:10.1128/AEM.01685-09.	28.02.2010
D03	WO 2011076894 A1 (INST UNIV DE CIENCIA I TECNOLOGIA S A et al.)	30.06.2011
D04	US 2007065922 A1 (BARAI VLADIMIR N et al.)	22.03.2007
D05	US 2007249023 A1 (ZUFFI GABRIELE et al.)	25.10.2007

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-19, es un biocatalizador que comprende la enzima nucleósido 2'-desoxirribosil-transferasa inmovilizada covalentemente en partículas sólidas (activadas con glutaraldehído) elaboradas a partir de magnetita atrapada en quitosano (reiv. 1-6). Es también objeto de la invención el procedimiento de obtención de dicho biocatalizador (reiv. 7-13), y el procedimiento para la obtención de nucleósidos mediante una reacción de transglicosilación catalizada por el biocatalizador de la invención (reiv. 14-19).

**Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).**

El documento D01 divulga la enzima nucleósido 2'-desoxirribosil-transferasa de *Lactobacillus reuteri*, inmovilizada covalentemente en partículas sólidas comerciales de Sepabeads®. Sin embargo, este mismo documento indica que aunque la enzima inmovilizada es capaz de sintetizar nucleósidos, no presenta actividad arabinosiltransferasa.

El documento D02 divulga la enzima nucleósido 2'-desoxirribosil-transferasa de *Lactobacillus reuteri*. En este caso, la enzima presenta actividad arabinosiltransferasa, pero no está inmovilizada.

Los documentos D03, D04 y D05 divulgan la síntesis de nucleósidos modificados, mediante reacciones de transglicosilación. Estas reacciones son catalizadas por enzimas nucleósido fosforilasas (como las purinas nucleósido fosforilasas) procedentes de microorganismos.

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados (D01-D05), tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-19. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por dichas reivindicaciones. Por lo tanto, el objeto de invención según se recoge en las reivindicaciones 1-19, cumple con el requisito de novedad e implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).