

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 854 296**

21 Número de solicitud: 202030228

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 19/30 (2006.01)

C12R 1/20 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

18.03.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.09.2021

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD EUROPEA DE MADRID, S.A.U.
(100.0%)

C/ Tajo s/n

28670 Villaviciosa de Odón (Madrid) ES

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ LUCAS, Jesús;
ACOSTA BUENO, Javier;
DEL ARCO ARRIETA, Jon;
CLEMENTE SUÁREZ, Vicente Javier;
PISABARRO MONTORO, Victor y
SOLERA SAINERO, Miriam

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

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

54 Título: **ENZIMA Y PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE NUCLEÓTIDOS EN UNA SOLA ETAPA MEDIANTE UN BIOCATALIZADOR BIFUNCIONAL**

57 Resumen:

Enzima y procedimiento para la obtención de nucleótidos en una sola etapa mediante un biocatalizador bifuncional.

Se da a conocer una enzima bifuncional, capaz de actuar o bien como una hipoxantinaguanina fosforribosiltransferasa o bien como una AMP quinasa, dependiendo de los sustratos con los que se confronte. También se dan a conocer ácidos nucleicos que codifican para dicha enzima, procedimientos para la obtención de dicha enzima, usos de dicha enzima y procedimientos para la obtención nucleótidos mediante el uso de dicha enzima.

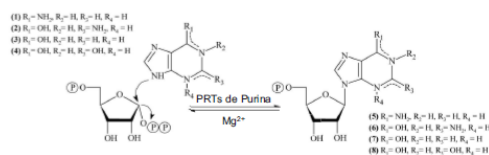


Fig. 1

DESCRIPCIÓN

ENZIMA Y PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE NUCLEÓTIDOS EN UNA SOLA ETAPA MEDIANTE UN BIOCATALIZADOR BIFUNCIONAL5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología aplicada. Más concretamente, se refiere al desarrollo de una nueva enzima y un nuevo procedimiento de obtención de nucleótidos mediante el empleo de dicha nueva enzima.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

Los nucleótidos son moléculas orgánicas formadas por la fosforilación del grupo hidroxilo (-OH) del carbono 5' (5' C) de nucleósidos o 2'-desoxinucleósidos, y son las piezas estructurales que conforman los ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico - en adelante, ADN - y ácido ribonucleico - en adelante ARN -), involucrados en el almacenamiento y la transferencia de información genética.

Dependiendo del grado de fosforilación, podemos distinguir 3 tipos de nucleótidos: nucleósidos-5'-monofosfato, nucleósidos-5'-difosfato o nucleósidos-5'-trifosfato.

La síntesis de nucleótidos se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante métodos químicos que implican la fosforilación de los nucleósidos precursores mediante el uso de reactivos contaminantes. A menudo estos procesos requieren del uso de reactivos químicos (cloruro de fosforilo, POCl_3 o pentóxido de fósforo, P_2O_5), condiciones ácidas y disolventes orgánicos, que son caros y nocivos para el medioambiente (Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. *B. Chem. Soc. Jpn.* 1969, 42, 3505–3508). Por otra parte, la glicosilación química del nucleósido precursor a menudo requiere de múltiples pasos, que incluyen reacciones de protección y desprotección de grupos en la base

heterocíclica y/o en la molécula de ribosa, para permitir la modificación de los nucleósidos naturales (Fresco-Taboada, A.; de la Mata, I.; Arroyo, M.; Fernández-Lucas, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 97, 3773-3785). Además, estas metodologías necesitan el control exhaustivo de la regio- y estereoselectividad para la formación del

5 enlace glicosídico C-N. Debido a estos factores, la síntesis química de nucleótidos generalmente proporciona bajos rendimientos globales y/o baja pureza del producto final. Estos procesos químicos también se asocian con condiciones de reacción extremas y con problemas de eliminación de desechos. En consecuencia, dichos inconvenientes conducen a un alto precio de los nucleósidos y nucleótidos, impidiendo

10 su uso clínico en muchos casos y limitando su aplicación en industrias como la farmacéutica o la alimentaria. Por ello, el descubrimiento de nuevos catalizadores capaces de llevar a cabo y facilitar la síntesis de este tipo de compuestos es muy relevante para la industria.

15 En las últimas décadas se ha convertido en una práctica habitual en la industria la sustitución parcial o total de los métodos químicos arriba mencionados por métodos enzimáticos (Boryski J. *Curr Org Chem* 2008, 12:309-325; Fresco-Taboada A, de la Mata I, Arroyo M, Fernández-Lucas J. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, 97:3773–3785; Fernández-Lucas, J. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015, 99, 4615-4627; Rozzell, J. D.

20 *Bioorg Med Chem* 1999, 7: 2253-2261).

La síntesis enzimática de NADs mediante células enteras o enzimas supone una interesante alternativa a los tradicionales métodos químicos que ofrece muchas ventajas, como la reacción en un solo recipiente (también conocida como “*one-pot*”),

25 bajo condiciones suaves de pH y temperatura, con una total estereo-, regio- y enantioselectividad y bajo unas condiciones respetuosas con el medio ambiente. Dichas reacciones se pueden llevar a cabo mediante una única enzima con el objetivo de llevar a cabo una reacción específica en una sola etapa (también conocido como, “*one-pot, one step*”), o bien mediante dos o más enzimas que actúen secuencialmente o en

30 paralelo (también conocido como, “*one-pot, x steps*”) para conseguir los productos deseados.

Diversos tipos de enzimas, como; nucleósido mono-, di-, o trifosfato quinasas (en adelante, NKs, por sus siglas en inglés) (Mori, H., Iida, A., Fujio, T., & Teshiba, S. *Appl*

35 *Microbiol Biotechnol* 1997, 48: 693-698; Serra, I., Conti, S., Piškur, J., Clausen, A. R.,

Munch-Petersen, B., Terreni, M., & Ubiali, D. *Advanc Synth Catal* 2014, 356: 563-570), fosfotransferasas ácidas (en adelante, AP/PTase, por sus siglas en inglés) (Mihara, Y., Utagawa, T., Yamada, H., & Asano, Y. *Appl Environm Microbiol* 2000, 66: 2811-2816), fosforribosiltransferasas (en adelante, PRT, por sus siglas en inglés) (Del Arco, J., & Fernández-Lucas, J. *Curr Pharm Des* 2017, 23: 6898-6912; Del Arco, J., Acosta, J., Pereira, H. M., Perona, A., Lokanath, N. K., Kunishima, N., & Fernández-Lucas, J. *ChemCatChem* 2018, 10: 439-448), sintetetasas (Fujio, T., Nishi, T., Ito, S., & Maruyama, A. *Biosci Biotechnol, Biochem* 1997, 61: 840-845), adenilato deaminasas (Li, S., Qian, Y., Liang, Y., Chen, X., Zhao, M., Guo, Y., & Pang, Z. *Appl Biochem Biotechnol* 2016, 180: 1635-1643) y las 5'-fosfodiesterasas (Zou, Z., Ding, Q., Ou, L., & Yan, B. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, 97:, 9389-9395); han sido descritas como biocatalizadores para la síntesis, en una o varias etapas, de nucleótidos naturales y no naturales (Fernández-Lucas, J. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015, 99: 4615-4627).

Entre las enzimas anteriormente mencionadas, las fosforribosiltransferasas y las nucleósido quinasas resultan de especial interés.

Las fosforribosiltransferasas de purinas y pirimidinas (en adelante, PRTs, por sus siglas en inglés) catalizan la transferencia reversible del grupo 5-fosforribosil del 5-fosfo- α -D-ribosil-1-pirofosfato (en adelante, PRPP, por sus siglas en inglés) a nucleobases o a sus derivados en presencia de Mg^{2+} . Dichas PRTs están involucradas en la formación de los enlaces glicosídicos C-N en nucleósido-5'-monofosfatos (en adelante, NMPs, por sus siglas en inglés), tanto en la ruta de salvamento como en la *de novo*, por lo que son esenciales para la síntesis de ácidos nucleicos (ARN y ADN). Las PRTs específicas para purinas catalizan la transferencia reversible del grupo 5'-fosforribosilo del PRPP al N9 de bases 6-amino o 6-oxopúricas, como adenina (fórmula (1) en la figura 1), hipoxantina (fórmula (2) en la figura 1), guanina (fórmula (3) en la figura 1) y xantina (fórmula (4) en la figura 1), en presencia de Mg^{2+} , obteniendo adenosina-5'-monofosfato (en adelante, AMP; fórmula (5) en la figura 1), inosina-5'-monofosfato (en adelante, IMP; fórmula (6) en la figura 1), guanosina-5'-monofosfato (en adelante, GMP; fórmula (7) en la figura 1) o xantina-5'-monofosfato (en adelante, XMP; fórmula (8) en la figura 1), respectivamente.

La especificidad de las PRTs varía según la naturaleza de la especie, pero en todos los casos, la actividad para adenina es distinta de la actividad sobre hipoxantina, guanina o

xantina. En este sentido, según su especificidad de sustrato, las PRTs de purinas se clasifican en dos clases generales:

- Por una parte, PRTs de 6-aminopurina, como la adenina fosforribosiltransferasa (en adelante, APRT, por sus siglas en inglés), estrictamente específicas para 6-aminopurinas, como la adenina, 2-fluoroadenina o 2-cloroadenina (Del Arco, J. & Fernández-Lucas, J. *Curr Pharm Des* 2017, 23: 6898-6912; Del Arco, J., Pérez, E., Naitow, H., Matsuura, Y., Kunishima, N., & Lucas, J. F. *Bioresour Technol* 2019, 276: 244-252).
- Por otra parte, las PRTs para 6-oxopurinas hipoxantina PRT (HPRT), guanina PRT (GPRT), xantina PRT (XPRT), hipoxantina-guanina PRT (HGPRT) o hipoxantina-guanina-xantina PRT (HGXPRT), capaces de reconocer diferentes 6-oxopurinas, tales como hipoxantina, guanina, xantina y otros análogos de 6-oxo y 6-mercaptapurina (Del Arco, J. & Fernández-Lucas, J. *Curr Pharm Des* 2017, 23: 6898-6912; Del Arco, J., Cejudo-Sanches, J., Esteban, I., Clemente-Suárez, V. J., Hormigo, D., Perona, A., & Fernández-Lucas, J. *Food chemistry* 2017, 237, 605-611).

Las adenosina monofosfato quinasas (en adelante, AMPK o AMP quinasa; EC 2.7.4.3), son un tipo particular de nucleósido quinasas que catalizan la conversión de un nucleósido trifosfato (preferentemente, adenosina trifosfato o ATP, por sus siglas en inglés) a nucleósido difosfato en presencia de un catión divalente, como Mg^{2+} , Mn^{2+} o Ca^{2+} (ver figura 2). El grupo aceptor del fosfato es la adenosina monofosfato (en adelante, AMP, por sus siglas en inglés) que es convertido a adenosina difosfato (en adelante, ADP, por sus siglas en inglés). Existen diversos tipos de isoformas de las diferentes especies, con mayor o menor promiscuidad a la hora de reconocer el nucleósido trifosfato (concretamente en humanos existen 9 isoformas) (Panayiotou, C., Solaroli, N., & Karlsson, A. *Int J Biochem Cell Biol* 2014, 49, 75-83; Van Rompay, A. R., Johansson, M., & Karlsson, A. *Pharmacol Ther*, 2000, 87, 189-198).

Sin embargo, en el estado de la técnica sigue existiendo la necesidad de disponer de nuevos catalizadores y procedimientos que permitan la síntesis de nucleótidos de forma sencilla, fácil, eficaz y económica que permitan una adecuada implementación industrial de los mismos y que faciliten y hagan viable la posibilidad de utilizar dichos nucleótidos en la industria farmacéutica y/o alimentaria.

Los inventores de la presente invención, tras extensos y exhaustivos experimentos, han descubierto, sorprendentemente, un biocatalizador bifuncional, capaz de actuar o bien como una hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (en adelante, HGPRT, por sus siglas en inglés) o bien como una AMP quinasa (en adelante, AMPK, por sus siglas en inglés), dependiendo de los sustratos con los que se confronte, permitiendo, por tanto, disponer de un procedimiento de obtención de nucleótidos en una sola etapa. La enzima descubierta por los inventores dispone de dos dominios independientes que corresponden a las dos actividades mencionadas.

10 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una enzima bifuncional que comprende los dominios HPGRT y AMPK.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de nucleótidos que comprende el uso de la enzima de la presente invención.

15

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de una enzima de la presente invención para la obtención de nucleótidos.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica para una enzima de la presente invención.

20

En un aspecto final, la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de una enzima de la presente invención.

25 Tal como se utiliza en el presente documento "porcentaje de identidad" y su plural, con respecto a péptidos, polipéptidos y proteínas, tienen el significado que comúnmente se les atribuye en el estado de la técnica y, por lo tanto, se refieren al porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre dos secuencias de aminoácidos que se comparan después de una alineamiento óptimo de sus secuencias, donde dicho porcentaje es
30 meramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias de aminoácidos se distribuyen aleatoriamente a lo largo de la secuencia. Se entiende por "alineamiento óptimo" aquel alineamiento de secuencias de aminoácidos que da lugar a un mayor porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas en las que un aminoácido es idéntico en las dos secuencias
35 comparadas, dividiendo el número de posiciones idénticas por el número de posiciones

comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre las dos secuencias. Las comparaciones de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se pueden llevar a cabo manualmente o mediante programas informáticos conocidos en el estado de la técnica, como el algoritmo BLAST (por sus siglas en inglés, Herramienta de búsqueda de alineamiento local básica).

Tal como se utiliza en el presente documento, "nucleótido" y "nucleótidos" hacen referencia a nucleósidos-5'-monofosfato, nucleósidos-5'-difosfato, nucleósidos-5'-trifosfato o combinaciones de los mismo.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Tal como se ha indicado anteriormente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una enzima que comprende los dominios HPGRT y AMPK.

15

La enzima de la presente invención puede actuar o bien como una hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) o bien como una AMP quinasa (AMPK), dependiendo de los sustratos utilizados en la reacción.

20 Más preferentemente, la enzima de la presente invención procede de *Zobellia galactanivorans*. Por tanto, preferentemente, la enzima de la presente invención comprende los dominios HPGRT y AMPK de *Zobellia galactanivorans* (ZgHGPRT/AMPK).

25 En una realización más preferente, la enzima de la presente invención comprende en su secuencia la secuencia SEQ ID NO: 1 (ZgHGPRT/AMPK).

También se contempla que la enzima de la presente invención comprenda secuencias con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, más preferentemente al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1, más preferentemente al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1, más preferentemente al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, más preferentemente un 99% de identidad con SEQ ID NO: 1; siempre y cuando dicha secuencia conserve la actividad de los dominios HPGRT y AMPK.

30

Se contempla que la enzima de la presente invención pueda comprender secuencias y/o dominios adicionales conocidos en el estado del arte, siempre y cuando se conserve la actividad de los dominios HPGRT y AMPK. Un ejemplo preferente de secuencia y/o dominio adicional sería la cola de 6 histidinas (para facilitar la purificación de la enzima de la presente invención) (Del Arco, J., Cejudo-Sanches, J., Esteban, I., Clemente-Suárez, V. J., Hormigo, D., Perona, A., & Fernández-Lucas, J. *Food chemistry* 2017, 237, 605-611).

En otra realización de la presente invención, la enzima de la presente invención consiste esencialmente de la secuencia SEQ ID NO: 1 o una secuencia con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, más preferentemente al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1, más preferentemente al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1, más preferentemente al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, más preferentemente un 99% de identidad con SEQ ID NO: 1; siempre y cuando dicha secuencia conserve la actividad de los dominios HPGRT y AMPK. Más preferentemente, en esta realización, la enzima de la presente invención consiste esencialmente de la secuencia SEQ ID NO: 1.

En otra realización de la presente invención, la enzima de la presente invención consiste de la secuencia SEQ ID NO: 1 o una secuencia con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, más preferentemente al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1, más preferentemente al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1, más preferentemente al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, más preferentemente un 99% de identidad con SEQ ID NO: 1; siempre y cuando dicha secuencia conserve la actividad de los dominios HPGRT y AMPK. Más preferentemente, en esta realización, la enzima de la presente invención consiste de la secuencia SEQ ID NO: 1.

La enzima de la presente invención puede obtenerse o producirse mediante cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, síntesis química, mediante tecnología recombinante en cultivo celular o mediante producción transgénica. Preferentemente, la enzima de la presente invención se obtiene o produce mediante tecnología recombinante en cultivo celular. Para ello, la enzima de la presente invención se puede obtener mediante la clonación y expresión del correspondiente gen (por ejemplo, gen *hgprrt/ampk* de *Zobellia galactanivorans*, caracterizado por la SEQ ID NO:

2, para el caso de la enzima de la presente invención con secuencia SEQ ID NO: 1) en una bacteria accesible como, por ejemplo, *Escherichia coli*. La enzima de la presente invención se puede obtener partiendo de secuencias cuya expresión da lugar a polipéptidos que muestran ambas actividades mencionadas anteriormente.

5

La enzima de la presente invención puede purificarse mediante cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica, preferentemente mediante cromatografía de afinidad.

10 Gracias al empleo de las enzimas de la presente invención se pueden sintetizar en una sola etapa mononucleótidos 6-oxopurínicos de interés en industria alimentaria, como por ejemplo inosina monofosfato (IMP, por sus siglas en inglés) o guanosina monofosfato (GMP, por sus siglas en inglés) (Behrens, M., Meyerhof, W., Hellfrisch, C., & Hofmann, T. *Angew Chem Int Ed* 2011, 50(10), 2220-2242), utilizando 5-fosfo- α -D-
15 ribosil-1-pirofosfato (PRPP) como donador de 5-fosforribosa, y bases nitrogenadas 6-oxopurínicas (preferentemente, hipoxantina o guanina) como aceptor.

Adicionalmente, el empleo de las enzimas de la presente invención permite además la obtención en una sola etapa de diversos tipos de nucleósidos-5'-monofosfato,
20 nucleósidos-5'-difosfato, y nucleósidos-5'-trifosfato, mediante la transferencia de grupos fosfato entre los diversos nucleótidos o desoxinucleótidos utilizados como sustratos.

Por tanto, las enzimas de la presente invención permiten resolver los problemas técnicos presentes en el estado de la técnica y mencionados anteriormente.

25

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de nucleótidos en una sola etapa a través de o mediante el uso de una enzima de la presente invención, capaz de actuar o bien como una hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) o bien como una AMP quinasa (AMPK), dependiendo
30 de los sustratos utilizados en la reacción.

Por tanto, en este segundo aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de nucleótidos caracterizado porque comprende la etapa de poner en contacto una enzima de la presente invención con al menos un sustrato adecuado.

35

La enzima de la presente invención es tal como se ha descrito anteriormente en el primer aspecto de la presente invención.

Preferentemente, en la etapa de poner en contacto una enzima de la presente invención
5 con al menos un sustrato adecuado, el al menos un sustrato adecuado es adecuado para la obtención del nucleótido o nucleótidos deseados.

En una primera realización preferente, el procedimiento es para la obtención de nucleósidos-5'-monofosfato, más preferente IMP o GMP, aún más preferentemente
10 IMP.

En esta primera realización preferente el al menos un sustrato adecuado es una nucleobase y un donador de grupo 5-fosforribosa. La nucleobase es, preferentemente, una base nitrogenada 6-oxopurínica, más preferentemente, guanina, hipoxantina o
15 combinaciones de las mismas, más preferentemente guanina o hipoxantina, aún más preferentemente hipoxantina. El donador de grupo 5-fosforribosa es, preferentemente, PRPP.

Tal como se ha indicado anteriormente, en esta primera realización preferente, cuando
20 en el procedimiento del segundo aspecto de la presente invención se utiliza como sustrato adecuado guanina y un donador de grupo 5-fosforribosa (preferentemente, PRPP) se obtiene GMP.

Adicionalmente, en esta primera realización preferente, cuando en el procedimiento del
25 segundo aspecto de la presente invención se utiliza como sustrato adecuado hipoxantina y un donador de grupo 5-fosforribosa (preferentemente, PRPP) se obtiene IMP.

En una segunda realización preferente, el procedimiento es para la obtención de
30 nucleósidos-5'-monofosfato, nucleósidos-5'-difosfato, nucleósidos-5'-trifosfato o combinaciones de los mismos. En este caso el al menos un sustrato adecuado es, preferentemente, AMP, ADP, ATP o combinaciones de los mismos. Más preferentemente, en una realización el al menos un sustrato adecuado es ADP. Aún más preferentemente, en otra realización el al menos un sustrato adecuado es AMP y
35 ATP.

Cuando ADP es el al menos sustrato adecuado en el procedimiento del segundo aspecto de la presente invención, se obtiene AMP y ATP.

- 5 Cuando AMP y ATP son el al menos un sustrato adecuado en el procedimiento del segundo aspecto de la presente invención, se obtiene ADP.

En cualquiera de las realizaciones explicadas para el segundo aspecto de la presente invención, la etapa de poner en contacto una enzima de la presente invención con al
10 menos un sustrato adecuado, la temperatura es, preferentemente, de entre 40 °C y 80 °C, más preferentemente entre 40 °C y 60 °C, más preferentemente entre 50 °C y 60 °C, aún más preferentemente 60 °C, condiciones en las que la enzima de la presente invención presenta una actividad máxima. También resulta preferente que en la etapa de poner en contacto una enzima de la presente invención con al menos un sustrato
15 adecuado, la temperatura sea de 40 °C, dado que en dichas condiciones la enzima de la presente invención es sorprendentemente estable.

Adicionalmente, en cualquiera de las realizaciones explicadas anteriormente del procedimiento del segundo aspecto de la presente invención, en dicha etapa de poner
20 en contacto una enzima de la presente invención con al menos un sustrato adecuado, el pH es, preferentemente entre 5,5 y 8, más preferentemente, entre 6 y 7, más preferentemente entre 6,5 y 7, aún más preferentemente 7.

Además, en cualquiera de las realizaciones explicadas anteriormente del procedimiento
25 del segundo aspecto de la presente invención en la etapa de poner en contacto una enzima de la presente invención con al menos un sustrato adecuado se contempla que dicha etapa se lleve a cabo utilizando una solución tampón. Dicha solución tampón puede ser cualquiera de los disponibles en el estado de la técnica, más preferentemente, tampón citrato, MES (ácido 2-etanosulfónico), tampón fosfato, tampón Tris-HCl o
30 BORAX (tetraborato de sodio), más preferentemente, tampón fosfato y, aún más preferentemente tampón fosfato 50 mM. Por tanto, de forma preferente la etapa de poner en contacto una enzima de la presente invención con al menos un sustrato adecuado se lleva a cabo en tampón fosfato (preferentemente, tampón fosfato 50 mM) a pH entre 6 y 7 (preferentemente, pH 7).

35

En una realización más preferente, en la etapa de poner en contacto una enzima de la presente invención con al menos un sustrato adecuado la temperatura es de 60 °C, el pH es 7 y se realiza en tampón fosfato (preferentemente, tampón fosfato 50 mM). En estas condiciones, la enzima de la presente invención muestra, sorprendentemente, una máxima actividad.

En otra realización más preferente, en la etapa de poner en contacto una enzima de la presente invención con al menos un sustrato adecuado la temperatura es de 40 °C, el pH es 7 y se realiza en tampón Tris-HCl (preferentemente, tampón Tris-HCl 10 mM). En estas condiciones, la enzima de la presente invención muestra, sorprendentemente, una estabilidad incrementada.

El procedimiento del segundo aspecto de la presente invención, tal y como demuestran los ejemplos incluidos en la presente memoria, se puede llevar a cabo tanto en medio acuoso como en presencia de disolventes orgánicos, lo que facilita su implementación a nivel industrial.

Por tanto, en cualquiera de las realizaciones explicadas anteriormente del procedimiento del segundo aspecto de la presente invención, se contempla que el procedimiento se lleve a cabo en presencia de al menos un disolvente orgánico, preferentemente disolventes orgánicos polares apróticos, alcoholes, polioles o combinaciones de los mismos, más preferentemente, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, isopropanol, metanol, glicerol, etilenglicol, propilenglicol o combinaciones de los mismos, aún más preferentemente, cloroformo, acetato de etilo, glicerol, etilenglicol o combinaciones de los mismos.

Preferentemente, dicho al menos un disolvente orgánico, en caso de estar presente, lo está a una concentración del 20% (volumen/volumen, v/v) o inferior.

En cualquiera de las realizaciones explicadas anteriormente del procedimiento del segundo aspecto de la presente invención, en la etapa de poner en contacto una enzima de la presente invención con al menos un sustrato adecuado, preferentemente se utiliza al menos un cofactor. Dicho cofactor es, preferentemente al menos un catión divalente, aún más preferentemente un catión divalente. Dicho catión divalente se puede utilizar

en cualquier forma conocida en el estado de la técnica y que en las condiciones del procedimiento del segundo aspecto de la presente invención proporcione el al menos un catión divalente de forma libre. Preferentemente, el al menos un catión divalente se utiliza en forma de sal, que en las condiciones del procedimiento se disocia proporcionando el catión divalente en forma libre.

El al menos un catión divalente puede ser cualquiera de los disponibles en el estado de la técnica; más preferentemente, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} o combinaciones de los mismos; más preferentemente Mg^{2+} , Co^{2+} o combinaciones de los mismos, aún más preferentemente Mg^{2+} (preferentemente en forma de sal, más preferentemente en forma de $MgCl_2$, $MgSO_4$ o combinaciones de los mismos).

El al menos un catión divalente se utiliza, preferentemente, en una concentración de entre 2 mM y 20 mM, más preferentemente entre 2 mM y 3 mM.

En una realización preferente, el procedimiento del segundo aspecto de la presente invención es un procedimiento para la obtención de nucleótidos en una sola etapa y que, por tanto, consiste de la etapa de poner en contacto una enzima de la presente invención con el al menos un sustrato adecuado. Dicha etapa es de acuerdo a lo indicado anteriormente.

Se contempla que antes del procedimiento del segundo aspecto de la presente invención se puedan llevar a cabo etapas preparatorias del mismo como, por ejemplo, etapa/s de purificación o preparación de la enzima de la presente invención; etapa/s de purificación o preparación del al menos un sustrato; o combinaciones de las mismas.

También se contempla que, tras el procedimiento del segundo aspecto de la presente invención se pueda llevar a cabo, si se considera necesario, la purificación de los nucleótidos.

Tal como se ha indicado anteriormente, en un tercer aspecto la presente invención se refiere al uso de una enzima de la presente invención para la obtención de nucleótidos.

La enzima de la presente invención es tal como se ha descrito anteriormente en el primer aspecto de la presente invención.

Por tanto, en este tercer aspecto de la invención la enzima de la presente invención se
5 usa en un procedimiento para la obtención de nucleótidos.

El procedimiento para la obtención de nucleótidos es tal y como se ha explicado anteriormente en el segundo aspecto de la presente invención.

10 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica para una enzima de la presente invención.

La enzima de la presente invención es de acuerdo a lo explicado anteriormente en el primer aspecto de la presente invención.

15 Por tanto, el ácido nucleico de la presente invención comprende las secuencias necesarias que codifican para la enzima de la presente invención.

En una realización preferente, el ácido nucleico de la presente invención comprende
20 una secuencia que codifica para los dominios HPGRT y AMPK, más preferentemente, los dominios HPGRT y AMPK de *Zobellia galactanivorans*, aún más preferentemente, la secuencia SEQ ID NO: 1.

En la realización más preferente, el ácido nucleico de la presente invención comprende
25 la secuencia SEQ ID NO: 2.

Se contempla que el ácido nucleico de la presente invención sea ADN o ARN, más preferentemente ADN.

30 Adicionalmente, se contempla que el ácido nucleico de la presente invención comprenda los elementos necesarios para la efectiva expresión y/o purificación de la enzima de la presente invención.

En un aspecto final, la presente invención se refiere a un procedimiento para la
35 obtención de una enzima de la presente invención.

La enzima de la presente invención es de acuerdo a lo explicado anteriormente en el primer aspecto de la presente invención.

- 5 Tal como se ha indicado anteriormente, la enzima de la presente invención puede obtenerse o producirse mediante cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, síntesis química, mediante tecnología recombinante en cultivo celular o mediante producción transgénica. Preferentemente, la enzima de la presente invención se obtiene o produce mediante tecnología recombinante en cultivo celular.

10

Por tanto, en una realización preferente, el procedimiento para la obtención de una enzima de la presente invención se basa en tecnología recombinante en cultivo celular. En esta realización el procedimiento para la obtención de una enzima de la presente invención comprendería las etapas de:

15

- a) clonación de un ácido nucleico que codifica para una enzima de la presente invención (preferentemente, clonación de un ácido nucleico de acuerdo al cuarto aspecto de la presente invención) en un vector de expresión;
- b) introducción del vector de expresión en un sistema de expresión;
- 20 c) expresión de la enzima de la presente invención en el sistema de expresión; y
- d) purificación de la enzima de la presente invención.

20

En la etapa a) del procedimiento del aspecto final de la presente invención se contempla la utilización de cualquier sistema de clonación y vector de expresión disponible en el
25 estado de la técnica.

25

En la etapa b) del procedimiento del aspecto final de la presente invención se contempla la utilización de cualquier sistema de expresión disponible en el estado de la técnica, más preferentemente el sistema de expresión es una bacteria accesible, aún más
30 preferiblemente *Escherichia coli*.

30

La enzima de la presente invención, en la etapa d), puede purificarse mediante cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica, más preferentemente mediante cromatografía de afinidad (por ejemplo, cuando la enzima incorpora una cola de 6 His). A
35 lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes

35

no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra “comprende” incluye el caso “consiste en”.

Para una mejor comprensión, la presente invención se describe en más detalle a
5 continuación en referencia las siguientes figuras y los siguientes ejemplos no limitativos.

La figura 1 muestra un esquema detallado de la síntesis enzimática de nucleósidos-5'-monofosfato catalizado por fosforribosiltransferasas.

10 La figura 2 muestra un esquema detallado de la síntesis enzimática de nucleósidos-5'-monofosfato catalizado por adenilato quinasa.

La figura 3 muestra el efecto de la temperatura en la actividad fosforribosiltransferasa de purinas de la enzima con secuencia SEQ ID NO: 1 (*ZgHGPRT/AMPK*) de acuerdo al
15 ejemplo 5. En esta figura se muestra la evolución de la actividad relativa fosforribosiltransferasa de purinas (porcentaje de actividad respecto a la máxima actividad de *ZgHGPRT/AMPK* obtenida en el experimento y que se establece como 100%) al variar la temperatura. En este sentido, el eje de las y muestra la actividad
relativa fosforribosiltransferasa de purinas (en %, según lo indicado anteriormente para
20 esta figura) y el eje de las x se refiere a la temperatura en °C.

La figura 4 muestra el efecto del pH en la actividad fosforribosiltransferasa de purinas de la enzima con secuencia SEQ ID NO: 1 (*ZgHGPRT/AMPK*) de acuerdo al ejemplo 5. En esta figura se muestra la evolución de la actividad relativa fosforribosiltransferasa de
25 purinas (porcentaje de actividad respecto a la máxima actividad de *ZgHGPRT/AMPK* obtenida en el experimento y que se establece como 100%) al variar el pH, para los diferentes medios o tampones ensayados, que son: tampón citrato (línea continua con círculos), MES (línea de guiones con triángulos), tampón fosfato (línea continua con
rombos), tampón Tris-HCl (línea de puntos con círculos con una cruz interior) y BORAX
30 (línea continua con triángulos). En este sentido, el eje de las y muestra la actividad
relativa fosforribosiltransferasa de purinas (en %, según lo indicado anteriormente para
esta figura) y el eje de las x se refiere al pH.

La figura 5 muestra el efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima con
35 secuencia SEQ ID NO: 1 (*ZgHGPRT/AMPK*), mediante estudios de desnaturalización

térmica de la enzima a diversos valores de temperatura (40-60 °C) en tampón Tris-HCl pH 7, 10 mM, de acuerdo a lo indicado en el ejemplo 5. Por tanto, la figura 5 muestra la variación de actividad relativa fosforribosiltransferasa de purinas (porcentaje de actividad respecto a la máxima actividad de *ZgHGPRT/AMPK* obtenida en el experimento y que se establece como 100%) con el tiempo a 40 °C (línea continua con rombos), a 50 °C (línea de guiones con cuadrados) y a 60 °C (línea de puntos y guiones con triángulos). En este sentido, el eje de las y muestra la actividad relativa fosforribosiltransferasa de purinas (en %, según lo indicado anteriormente para esta figura) y el eje de las x se refiere tiempo transcurrido en minutos.

10

La figura 6 muestra la actividad fosforribosiltransferasa de purinas de la enzima con secuencia SEQ ID NO: 1 (*ZgHGPRT/AMPK*) en presencia de un 20 % (v/v) de disolventes polares apróticos (acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido), alcoholes (etanol, isopropanol, metanol) y polioles (glicerol, etilenglicol y propilenglicol) o en medio acuoso, de acuerdo al ejemplo 6. La actividad fosforribosiltransferasa de purinas obtenida se expresa como porcentaje en relación con la actividad de *ZgHGPRT/AMPK* observada en medio acuoso que se establece como 100%. Tanto en la figura 6A como 6B, el eje de las y se refiere a la actividad relativa fosforribosiltransferasa de purinas de *ZgHGPRT/AMPK* expresada en porcentaje en relación con la actividad de dicha enzima en medio acuoso que se establece como 100%. En la figura 6A, en el eje de las x, los grupos mencionados son, de izquierda a derecha: medio acuoso, acetonitrilo, acetona, cloroformo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y acetato de etilo. En la figura 6B, en el eje de las x, los grupos mencionados son, de izquierda a derecha: medio acuoso, metanol, etanol, isopropanol, glicerol, etilenglicol y propilenglicol.

25

La figura 7 muestra el efecto de la adición de cationes divalentes en la actividad fosforribosiltransferasa de purinas de la enzima con secuencia SEQ ID NO: 1 (*ZgHGPRT/AMPK*) de acuerdo al ejemplo 7. En esta figura se muestra la evolución de la actividad relativa fosforribosiltransferasa de purinas de *ZgHGPRT/AMPK* (porcentaje de actividad respecto a la máxima actividad de *ZgHGPRT/AMPK* obtenida en el experimento y que se establece como 100%) con el uso de diferentes cationes divalentes a diferentes concentraciones. Los diferentes grupos mostrados en esta figura son: MgSO_4 (línea continua con rombos), MnSO_4 (línea de guiones con cuadrados), ZnSO_4 (línea continua con triángulos), CoSO_4 (línea de puntos con cuadrados) y CaCl_2

35

(línea continua con círculos). En este sentido, el eje de las y muestra la actividad relativa fosforribosiltransferasa de purinas (en % de actividad según lo indicado anteriormente para esta figura) y el eje de las x se refiere a la concentración del catión divalente utilizado en mM.

5

Ejemplo 1. Construcción del microorganismo recombinante *E. coli* *ZgHGPRT/AMPK*

Partiendo del genoma de la bacteria marina Gram negativa *Zobellia galactanivorans* DsiJT, perteneciente a la familia Flavobacteriaceae, alojada en la base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institute of Health, GenBank), se llevó a cabo la

10 búsqueda bioinformática en el mismo de secuencias de ADN que pudieran codificar posibles hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasas y adenilato quinasas putativas empleando los algoritmos BlastN y BlastP respectivamente (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. *J. Mol. Biol.* 1990, 215:403-410) a través del servidor del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Como resultado de

15 ello, se encontró la secuencia génica con número de acceso GenBank: CAZ96627.1, que parecía codificar para una proteína con dos dominios, un primer dominio hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT), y otro correspondiente a adenilato quinasa (AMPK). Por ello se decidió nombrar este gen como *hprt/ampk* (SEQ ID NO: 2) así como *ZgHGPRT/AMPK* (SEQ ID NO: 1) a la proteína obtenida de dicho

20 gen. Mediante el alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la traducción de gen *hprt/ampk* con secuencias de otras HGPRT y AMPK, se observó que efectivamente el polipéptido resultante contenía ambos dominios. Para llevar a cabo dicho alineamiento se empleó el programa Clustal Ω (Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R. *Nucleic acids research* 2010, 38 Suppl:

25 W695-9) alojado en el servidor EMBL-EBI.

Una vez efectuado el análisis bioinformático del gen de interés, se procedió a la síntesis del mismo, así como su inclusión como fragmento *NheI-BamHI* dentro del vector de expresión pET28b(+) (Novagen), dando como resultado el plásmido recombinante

30 pET28b_{ZgHGPRT/AMPK}. Dicho vector portaba un marcador de resistencia a Kanamicina, un promotor de expresión *lac* inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) para su selección en este género y una secuencia de ADN que codificaría para la presencia de 6 histidinas en el extremo N-terminal de la proteína, dando como resultado la proteína de fusión His-*ZgHGPRT/AMPK* (proteína *ZgHGPRT/AMPK* con una cola de 6 histidinas,

35 estructura utilizada en los ejemplos 1 a 9 del presente texto) . A continuación, se llevó a

cabo la transformación mediante choque térmico de células competentes de *E. coli* BL21(D3) obtenidas previamente según el procedimiento de cloruro de rubidio (RbCl) (Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, USA) y se obtuvieron clones recombinantes que expresaban de forma constitutiva el gen *hprt/ampk* (nombrados *E. coli* ZgHGPRT/AMPK). Los transformantes se seleccionaron en medio Luria-Bertani sólido al que se le había adicionado kanamicina (50 µg/ml). Mediante este procedimiento se obtuvieron varios clones que se analizaron mediante electroforesis de los plásmidos purificados, mediante el procedimiento High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche), en geles de agarosa al 1 % (peso/volumen) y posterior secuenciación utilizando los oligonucleótidos cebador promotor T7 (SEQ ID NO: 3) y cebador terminador T7 (SEQ ID NO: 4).

Ejemplo 2. Producción y purificación de la ZgHGPRT/AMPK

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

Posteriormente con las fracciones más puras se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular mediante la aplicación de la muestra en una columna Hi-Load 16/60 Superdex 200 prep grade column (GE Healthcare) previamente equilibrada con el

tampón 3 (20 mM Tris-HCl, pH 7). Para los procesos de purificación se utilizó un equipo de purificación de proteínas de media presión (FPLC, por sus siglas en inglés) modelo Akta Prime (GE Healthcare). Las fracciones se analizaron mediante electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida en presencia de SDS al 0,1 % (peso/volumen) (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico; SDS-PAGE por sus siglas en inglés).

Ejemplo 3. Determinación y caracterización de la actividad fosforribosiltransferasa de purinas de ZgHGPRT/AMPK

Para la determinación de la actividad fosforribosiltransferasa de purinas de la proteína ZgHGPRT/AMPK, se llevó a cabo el ensayo de actividad estándar que consistió en la síntesis de inosina-5'-monofosfato (IMP) a partir de hipoxantina y PRPP. Para ello diversas concentraciones de enzima se añadieron a una solución de hipoxantina 2 mM, PRPP 2 mM, MgCl₂ 12 mM en tampón Tris-HCl 12 mM, pH 8. La reacción transcurrió a pH 8, 50°C y se mantuvo en agitación a 350 rpm en un intervalo comprendido entre 0 y 10 minutos, con el objetivo de determinar el intervalo de tiempo en el que la enzima ZgHGPRT/AMPK muestra una respuesta lineal. La reacción se detuvo añadiendo un volumen de metanol previamente enfriado a 4 °C, y posteriormente se calentó a 95 °C con el objetivo de desnaturalizar la enzima ZgHGPRT/AMPK. Posteriormente, tras la centrifugación, los productos obtenidos fueron determinados mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) según la metodología descrita en el estado del arte (Fernández-Lucas J. *et al.* (2007) *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1147-1155). En estas condiciones de reacción, una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de biocatalizador (mg) que produce 1 µmol de inosina-5'-monofosfato por minuto (IU, µmol/min). Bajo estas condiciones, ZgHGPRT/AMPK mostró un valor de actividad específica de 0,26 IU/mg en la síntesis de IMP.

Ejemplo 4. Determinación y caracterización de la actividad AMP quinasa en ZgHGPRT/AMPK

Para la determinación de la actividad AMP quinasa de la proteína ZgHGPRT/AMPK, se llevó a cabo el ensayo de actividad estándar que consistió en la síntesis de ADP, a partir de AMP y ATP. Para ello diversas concentraciones de enzima ZgHGPRT/AMPK se añadieron a una solución de ATP 3.2 mM, AMP 3.2 mM, MgCl₂ 12 mM, en tampón fosfato 12 mM, pH 7. La reacción se mantuvo en agitación a 350 rpm y a 50 °C en un intervalo de tiempo comprendido entre 0 y 10 minutos, con el objetivo de determinar el

intervalo de tiempo en el que la enzima ZgHGPRT/AMPK muestra una respuesta lineal. La reacción se detuvo añadiendo un volumen de metanol previamente enfriado a 4 °C, y posteriormente se calentó a 95 °C con el objetivo de desnaturalizar la enzima ZgHGPRT/AMPK. Posteriormente tras la centrifugación, los productos obtenidos fueron

5 determinados mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) según la metodología descrita en el estado de la técnica (Fernández-Lucas J. *et al.* (2007) *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1147-1155). En estas condiciones de reacción, una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de biocatalizador (mg) que produce 1 µmol de ADP por minuto (IU, µmol/min). Bajo estas condiciones, ZgHGPRT/AMPK mostró un

10 valor de actividad específica de 0,09 IU/mg en la síntesis de ADP.

Ejemplo 5. Efecto del pH, temperatura y disolventes sobre la actividad y estabilidad de ZgHGPRT/AMPK.

Para analizar los efectos del pH, temperatura y disolventes sobre ZgHGPRT/AMPK se

15 procedió a determinar la actividad fosforribosiltransferasa de la enzima sobre hipoxantina a diferentes valores de pH (3-11) y temperatura (20-80 °C), observándose que la enzima mostró valores de actividad retenida superiores al 80 % en un amplio intervalo de temperatura (40-80 °C) (ver resultados obtenidos y que aparecen resumidos en la figura 3), pero en un margen reducido de pH (5,5-8, preferentemente, 6-7) (ver

20 resultados obtenidos y que aparecen resumidos en la figura 4). Particularmente interesante es el hecho de que la enzima presentó valores de actividad mayor del 95 % en el intervalo de temperatura de 50-60 °C, lo cual permitiría utilizar temperaturas moderadamente altas para poder solubilizar mejor los sustratos de reacción. Tal como se observa en la figura 3, la máxima actividad se obtuvo a 60°C. Tal como se observa

25 en la figura 4, la máxima actividad se obtuvo con tampón fosfato 50 mM a pH 7.

Ateniéndonos a los resultados obtenidos, las condiciones óptimas de uso de las enzimas de la presente invención (ejemplificadas por medio de ZgHGPRT/AMPK) serían en el intervalo de temperatura de 40-60 °C y a un pH de 6,5-7. Cómo condiciones estándar y

30 óptimas para la cuantificación de la actividad enzimática se eligieron tampón fosfato, pH 7 y 60 °C. En esas condiciones el biocatalizador ZgHGPRT/AMPK mostró una actividad de 0.53 unidades internacionales de actividad (UI, micromoles/min) por mg de enzima (mg) en la síntesis de IMP.

Además, se evaluó el efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima mediante estudios de desnaturalización térmica de la enzima a diversos valores de temperatura (40 °C, 50 °C y 60 °C) en Tris-HCl 10 mM, pH 7 (ver resultados obtenidos y que aparecen resumidos en la figura 5) observándose que mantiene hasta un 80 % de actividad fosforribosiltransferasa sobre hipoxantina tras ser incubada a 40 °C durante 4 horas (20 % de pérdida de actividad), de lo que se deduce que la enzima es estable en esas condiciones. Por el contrario, la enzima experimentó un acusado descenso en la actividad fosforribosiltransferasa sobre hipoxantina cuando fue incubada a 50 °C y 60 °C periodos superiores a 20 minutos (pérdida de actividad mayor del 30 % y 90 %, respectivamente), indicando que la estabilidad de la misma se vio afectada en esas condiciones.

Ejemplo 6. Efecto de la adición de disolventes orgánicos sobre la actividad fosforribosiltransferasa de purinas de ZgHGPRT/AMPK.

Adicionalmente se ha evaluado el efecto de la adición de disolventes orgánicos en la actividad fosforribosiltransferasa sobre hipoxantina de la enzima ZgHGPRT/AMPK (ver resultados obtenidos y que aparecen resumidos en las figuras 6A y 6B) bajo sus condiciones óptimas de pH y temperatura. En este sentido se ha evaluado la actividad fosforribosiltransferasa de purinas de la enzima en presencia de un 20 % (v/v) de disolventes orgánicos como por ejemplo disolventes polares apróticos (acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido), alcoholes (etanol, isopropanol, metanol) y polioles (glicerol, etilenglicol y propilenglicol). Como se puede observar en las figuras 6A y 6B se obtuvieron valores de actividad retenida superiores al 45 % en todos los casos, lo que demuestra una gran tolerancia a disolventes orgánicos. De hecho, tal y como se deriva de las figuras 6A y 6B se pudo demostrar que la actividad de la enzima de la presente invención no se ve afectada por la presencia de un 20 % (v/v) de cloroformo, acetato de etilo, glicerol o etilenglicol. Adicionalmente, en dichas figuras se observa que la actividad de la enzima se ve reducida en torno a un 15-40 % en presencia de un 20 % (v/v) de acetonitrilo, DMSO, etanol, metanol o propilenglicol, mientras que, en presencia de acetona, DMF o isopropanol la actividad de la enzima se redujo entre un 40 - 50 % de la actividad inicial.

Esta tolerancia de la enzima ZgHGPRT/AMPK a la utilización de disolventes orgánicos, es de gran ayuda de cara a la posible utilización de la enzima ZgHGPRT/AMPK a nivel industrial.

Ejemplo 7. Efecto de la presencia de cationes divalentes sobre la actividad fosforribosiltransferasa de purinas de *ZgHGPRT/AMPK*.

- 5 Se evaluó el efecto de la adición de cationes divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Ca^{2+}) como cofactores en la actividad de *ZgHGPRT/AMPK*. En este sentido se evaluaron diversas sales divalentes como por ejemplo $MgCl_2$, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $CoSO_4$ y $CaCl_2$. Las condiciones de reacción fueron:
- 10 - 6,5 microgramos de enzima *ZgHGPRT/AMPK* en 40 μ l a 60 °C, 5-10 min, 300 rpm. concentración de hipoxantina = 2 mM, concentración de PRPP= 2 mM, concentración de catión divalente ($[M^{2+}]$)= 2-20 mM en tampón fosfato 50 mM, pH 7.

Los resultados obtenidos en este ejemplo aparecen resumidos en la figura 7. A la vista de los resultados que se muestran en la figura 7, se pudo observar que en todos los casos la mejor actividad fosforribosiltransferasa de purinas fue obtenida cuando se utilizaron sales divalentes de Mg^{2+} (100 % actividad relativa en $MgCl_2$ y $MgSO_4$ en el rango de concentraciones 2-20 mM). En el caso de Co^{2+} (80 % actividad relativa), Zn^{2+} (63 % de actividad relativa) y Mn^{2+} (68 % de actividad relativa) la actividad enzimática se vio afectada a concentraciones superiores a 3 mM. Finalmente, en el caso de Ca^{2+} la actividad se vio drásticamente afectada (20 % de actividad relativa) incluso a concentraciones bajas (2 mM).

De lo indicado anteriormente se deduce que los mejores resultados en presencia de Mg^{2+} (100 % actividad relativa), y Co^{2+} (80 % actividad relativa), siendo aún más sorprendentes y superiores los obtenidos para Mg^{2+} .

En resumen, se demostró que la actividad de la enzima no se ve afectada cuando la enzima fue incubada en $MgSO_4$ en el rango de 2-20 mM (tampoco se ve afectada por $MgCl_2$ en dicho rango de concentraciones), mientras que para el resto de M^{2+} la actividad enzimática se vio afectada a concentraciones superiores a 3 mM.

Ejemplo 8. Síntesis de diferentes nucleósidos-5'-monofosfato mediante el empleo de la actividad fosforribosiltransferasa de purinas de *ZgHGPRT/AMPK*

A continuación, se explica el procedimiento para la síntesis de diferentes nucleósidos-5'-monofosfato mediante el empleo como biocatalizador de la enzima *ZgHGPRT/AMPK*

de la presente invención. En los diferentes ejemplos que se presentan, los productos de reacción se pueden cuantificar mediante HPLC utilizando las siguientes condiciones: columna ACE 5 C18-CN (250 x 4,6 mm); fase móvil: 20 minutos de acetato de trimetilamonio 0.1 M. El flujo se fija a 0,8 ml/min (180 bares de presión) y el detector UV se ajusta a 260 nm. En estas condiciones, los tiempos de retención de las bases y nucleósidos detectados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Tiempos de retención de bases, 2'-desoxinucleosidos y nucleósidos en las condiciones de HPLC indicadas en el ejemplo 7.

<u>Sustratos</u>	<u>Tiempo de retención (min)</u>
<u>Bases</u>	
Adenina	11,4
Guanina	6,1
Hipoxantina	5,6
Timina	7,2
Uracilo	4,6
Xantina	5,0
<u>Nucleótidos</u>	
AMP	4,4
ADP	4,0
ATP	3,5

10

Para llevar a cabo el presente ejemplo, la enzima *ZgHGPRT/AMPK* se incubó en condiciones óptimas de actividad y estabilidad (descritas en el ejemplo 5) utilizando diferentes bases nitrogenadas (Adenina, Hipoxantina, Guanina y Xantina) en presencia PRPP y MgCl₂. Las condiciones de reacción fueron:

- 15 – 6,5 microgramos enzima *ZgHGPRT/AMPK* en 40 µl a 60 °C, 5-10 min, 300 rpm. Concentración de la base utilizada= 2 mM, concentración de PRPP= 2 mM, concentración de MgCl₂= 12 mM; tampón fosfato 50 mM, pH 7, para Adenina, Hipoxantina, Timina y Uracilo.
- 20 – 6,5 microgramos de enzima *ZgHGPRT/AMPK* en 40 µl a 60 °C, 5-10 min, 300 rpm. concentración de la base utilizada= 2 mM, concentración de MgCl₂= 12 mM; tampón Tris-HCl 12 mM, pH 8, para Guanina y Xantina.

Como se puede observar en la Tabla 2, la enzima *ZgHGPRT/AMPK* de la presente invención reconoce de manera similar a la Guanina y a la Hipoxantina, no sucediendo lo mismo con Adenina y Xantina sobre las que no mostró actividad alguna. Por otra parte, la enzima no mostró actividad fosforribosiltransferasa sobre bases pirimidínicas, (timina y uracilo, ver resultados incluidos en la Tabla 2). Por tanto, la enzima de la presente invención (ejemplificada por medio de la enzima *ZgHGPRT/AMPK*) puede sintetizar GMP y IMP a partir de guanina e hipoxantina, respectivamente.

Tabla 2. Síntesis de nucleósidos-5'-monofosfato mediante la enzima *ZgHGPRT/AMPK*

Base	Actividad Específica (IU/mg)
Adenina	-
Guanina	0,43
Hipoxantina	0,53
Xantina	-
Uracilo	-
Timina	-

Ejemplo 9. Síntesis de diferentes nucleótidos mediante el empleo de la actividad adenilato quinasa de *ZgHGPRT/AMPK*

A continuación, se explica el procedimiento para la síntesis de diferentes nucleótidos mediante el empleo como biocatalizador de la enzima *ZgHGPRT/AMPK* (los resultados aparecen resumidos en la Tabla 3). En los diferentes ejemplos que se presentan, los productos de reacción se cuantificaron mediante HPLC, utilizando las condiciones de análisis descritas en el ejemplo 8. En estas condiciones, los tiempos de retención de las bases y nucleótidos detectados se presentan en la Tabla 1.

Para llevar a cabo el presente ejemplo la enzima *ZgHGPRT/AMPK* se incubó en condiciones óptimas de actividad y estabilidad (descritas previamente en el Ejemplo 5) utilizando AMP, ADP y/o ATP en presencia de $MgCl_2$. Las condiciones de reacción fueron:

- 13 microgramos de enzima *ZgHGPRT/AMPK* en 40 μ l a 60 °C, 10-20 min, 300 rpm. Concentración de ATP= Concentración de AMP= 3.2 mM, concentración de $MgCl_2$ = 12 mM; en tampón fosfato 12 mM, pH 7.
- 13 microgramos de enzima *ZgHGPRT/AMPK* en 40 μ l a 60 °C, 10-20 min, 300 rpm. Concentración de ADP= 6.4 mM, concentración de $MgCl_2$ = 12 mM; en tampón fosfato 12 mM, pH 7.

Como se puede observar en la Tabla 3, la enzima *ZgHGPRT/AMPK* funciona mejor en la reacción directa, es decir la síntesis de ADP a partir de ATP+AMP, que en la reacción inversa (la síntesis de AMP y ATP a partir ADP), sin embargo, la enzima de la presente invención se mostró útil para ambas reacciones y, por tanto, para la síntesis de AMP, ADP y ATP.

Tabla 3. Síntesis de nucleósidos-5'-monofosfato, nucleósidos-5'-difosfato y nucleósidos-5'-trifosfato mediante *ZgHGPRT/AMPK*

Donador	Aceptor	Producto 1	Actividad Específica (IU/mg)	Producto 2	Actividad Específica (IU/mg)
ADP	ADP	AMP	0,03	ATP	0,03
ATP	AMP	ADP	0,09	-	-

REIVINDICACIONES

- 5 1. Enzima caracterizada porque comprende los dominios HPGRT y AMPK.
2. Enzima según la reivindicación 1, caracterizada porque los dominios HPGRT y AMPK son los dominios HPGRT y AMPK de *Zobellia galactanivorans*.
- 10 3. Enzima según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque comprende en su secuencia la secuencia SEQ ID NO: 1.
4. Enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque consiste de la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 15 5. Procedimiento para la obtención de nucleótidos caracterizado porque comprende una etapa de poner en contacto una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con al menos un sustrato adecuado.
- 20 6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque el procedimiento es un procedimiento para la obtención de nucleósidos-5'-monofosfato y porque el al menos un sustrato adecuado es una nucleobase y un donador de grupo 5-fosforribosa.
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la nucleobase es una base nitrogenada 6-oxopurínica.
8. Procedimiento según la reivindicación 6 ó 7, caracterizado porque la nucleobase es guanina o hipoxantina.
- 30 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado porque el donador de grupo 5-fosforribosa es 5-fosfo- α -D-ribosil-1-pirofosfato.
10. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque el al menos un sustrato es AMP, ADP, ATP o combinaciones de los mismos.
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque el procedimiento es para la obtención de ADP y porque el al menos un sustrato es AMP y ATP.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque el procedimiento es para la obtención de AMP y ATP y porque el al menos un sustrato es ADP.
- 5 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, caracterizado porque en la etapa de poner en contacto una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con al menos un sustrato la temperatura es de entre 40 °C y 80 °C.
- 10 14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque la temperatura es entre 40 °C y 60 °C.
- 15 15. Procedimiento según la reivindicación 13 ó 14, caracterizado porque la temperatura es 60 °C.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, caracterizado porque la temperatura es 40°C.
- 20 17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16, caracterizado porque en la etapa de poner en contacto una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con al menos un sustrato el pH es de entre 5,5 y 8.
18. Procedimiento según la reivindicación 17, caracterizado porque el pH es de entre 6 y 7.
- 25 19. Procedimiento según la reivindicación 17 ó 18, caracterizado porque el pH es 7.
- 30 20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 19, caracterizado porque la etapa de poner en contacto una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con al menos un sustrato se lleva a cabo en una solución tampón.
21. Procedimiento según la reivindicación 20, caracterizado porque la solución tampón es tampón fosfato.
- 35 22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 21, caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo en presencia de al menos un disolvente orgánico.

23. Procedimiento según la reivindicación 22, caracterizado porque el al menos un disolvente orgánico se selecciona de entre disolventes orgánicos polares apróticos, alcoholes, polioles o combinaciones de los mismos.
- 5 24. Procedimiento según la reivindicación 22 ó 23, caracterizado porque el al menos un disolvente orgánico se selecciona entre acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, isopropanol, metanol, glicerol, etilenglicol, propilenglicol o combinaciones de los mismos.
- 10 25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, caracterizado porque la concentración del al menos un disolvente orgánico es del 20% (v/v) o inferior.
- 15 26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 25, caracterizado porque en la etapa de poner en contacto una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con al menos un sustrato se utiliza al menos un cofactor.
- 20 27. Procedimiento según la reivindicación 26, caracterizado porque el al menos un cofactor es al menos un catión divalente.
28. Procedimiento según la reivindicación 27, caracterizado porque el al menos un catión divalente es Mg^{2+} , Co^{2+} o combinaciones de los mismos.
- 25 29. Procedimiento según la reivindicación 27 ó 28, caracterizado porque el al menos un catión divalente es Mg^{2+} .
- 30 30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, caracterizado porque la concentración del al menos un catión divalente es de entre 2 mM y 20 mM.
31. Procedimiento según la reivindicación 30, caracterizado porque la concentración del al menos un catión divalente es de entre 2 mM y 3 mM .
- 35 32. Uso de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la obtención de nucleótidos.

33. Ácido nucleico caracterizado porque codifica para una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
34. Ácido nucleico según la reivindicación 33, caracterizado porque comprende la
5 secuencia SEQ ID NO: 2.
35. Procedimiento para la obtención de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

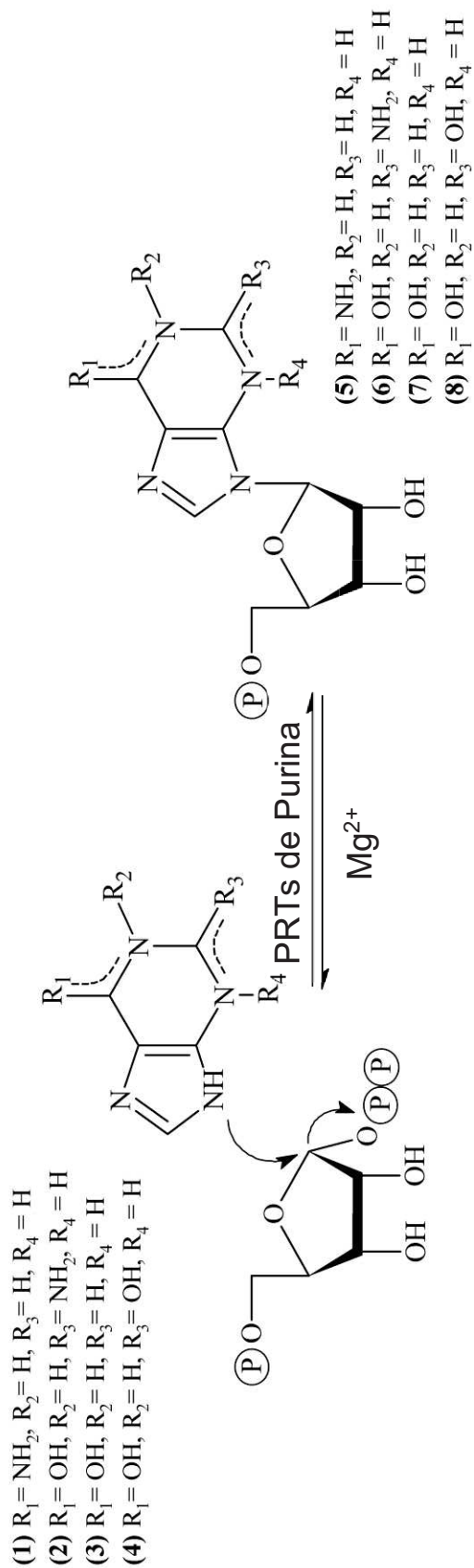


Fig. 1

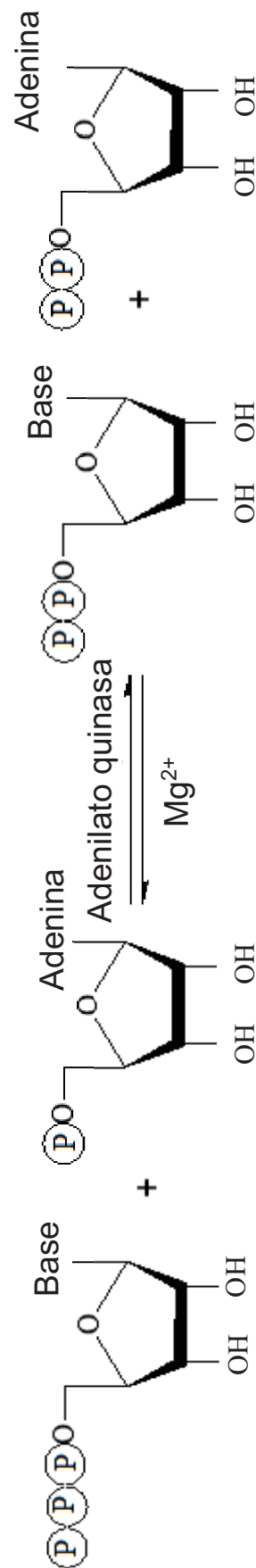


Fig. 2

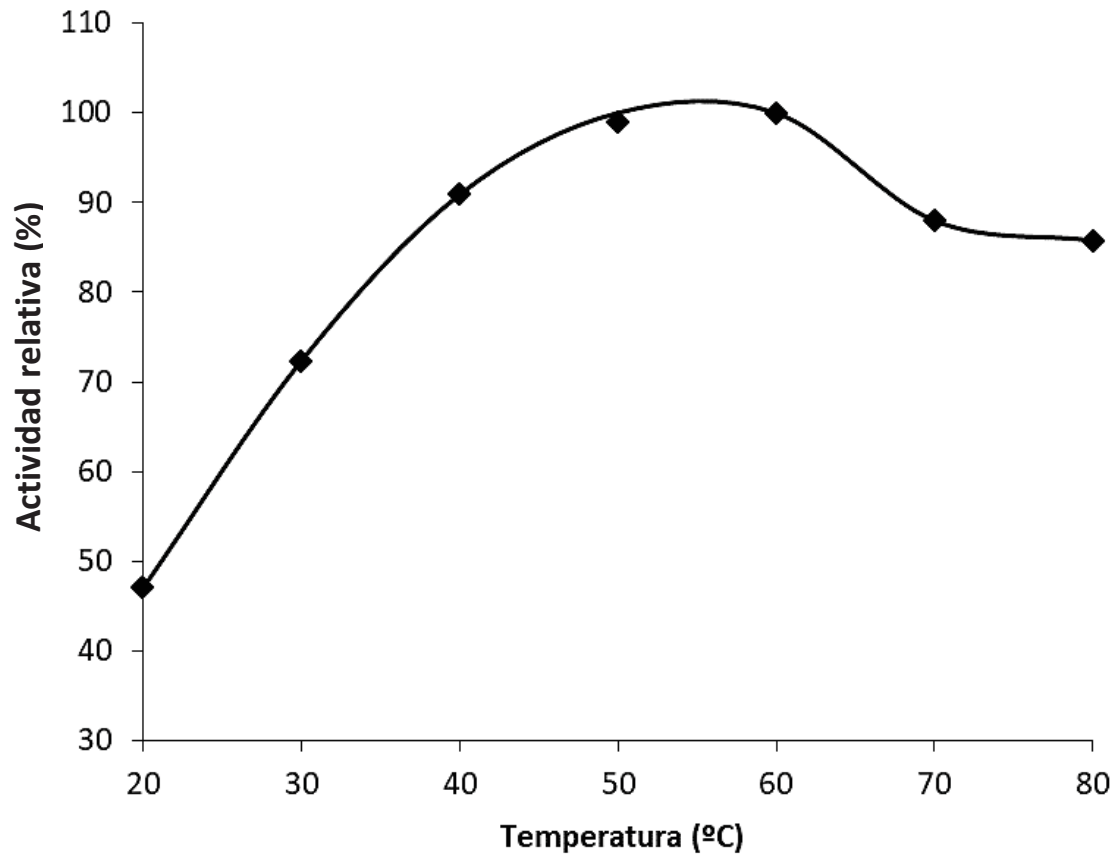


Fig. 3

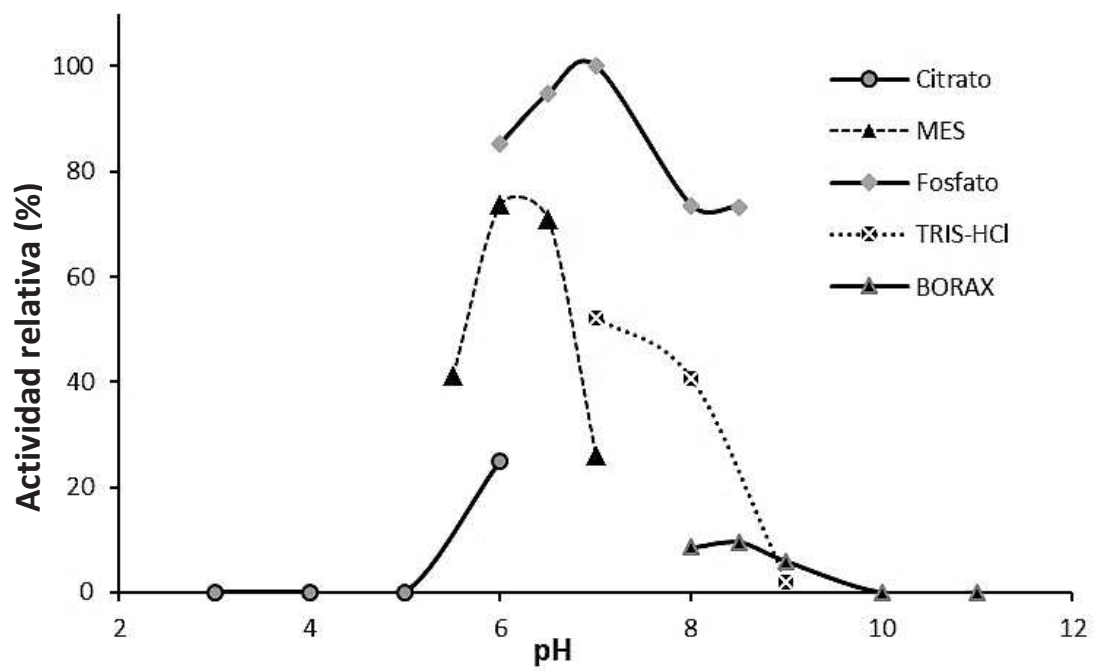
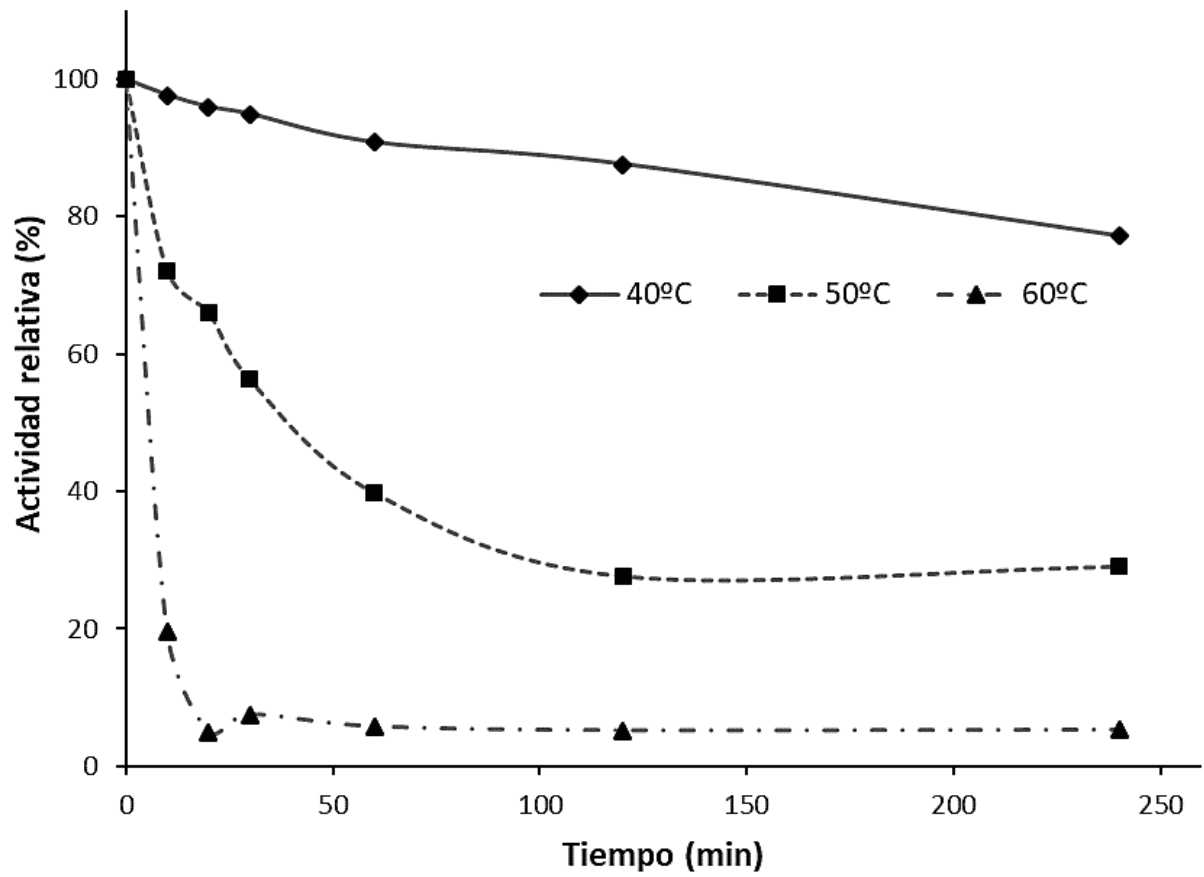


Fig. 4

Fig. 5

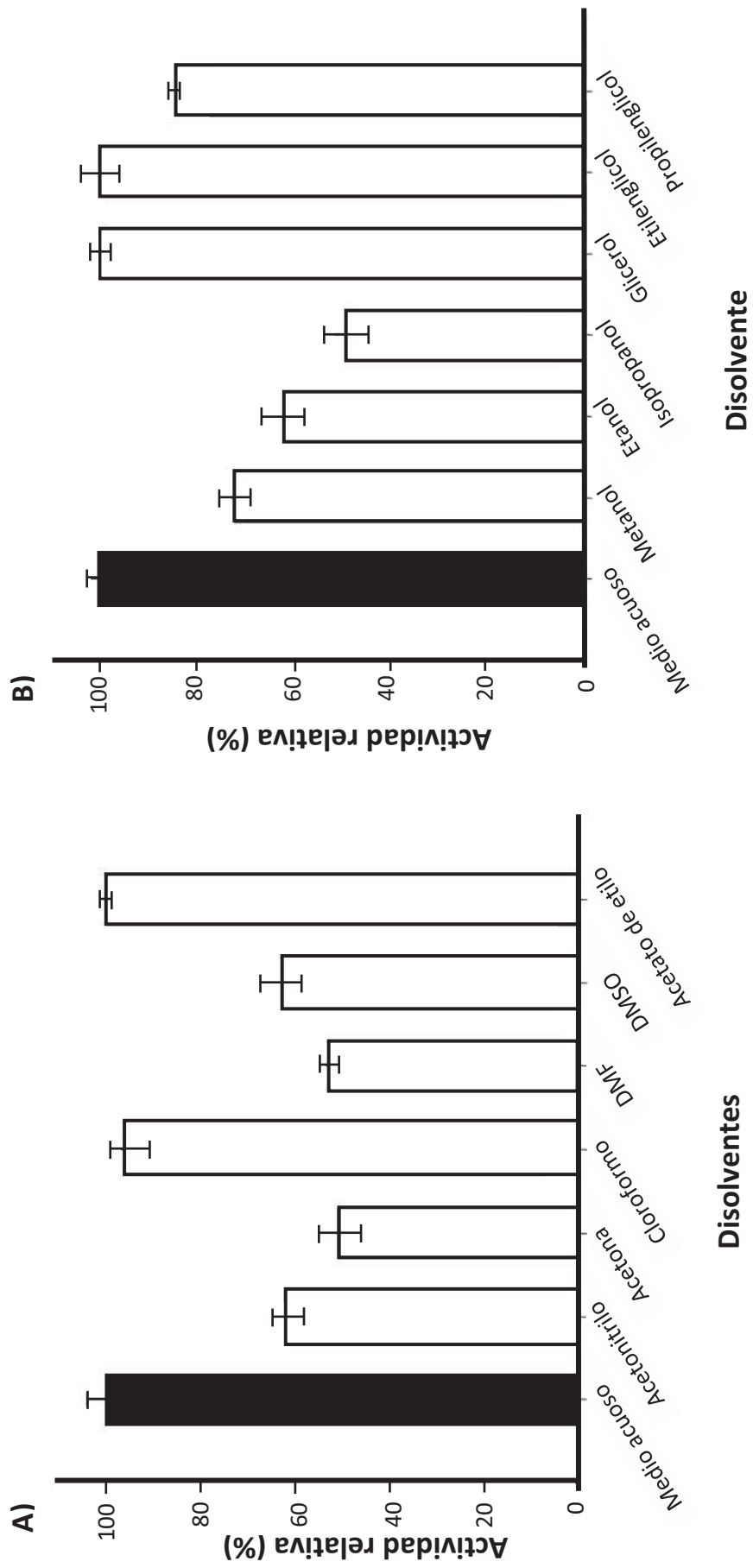
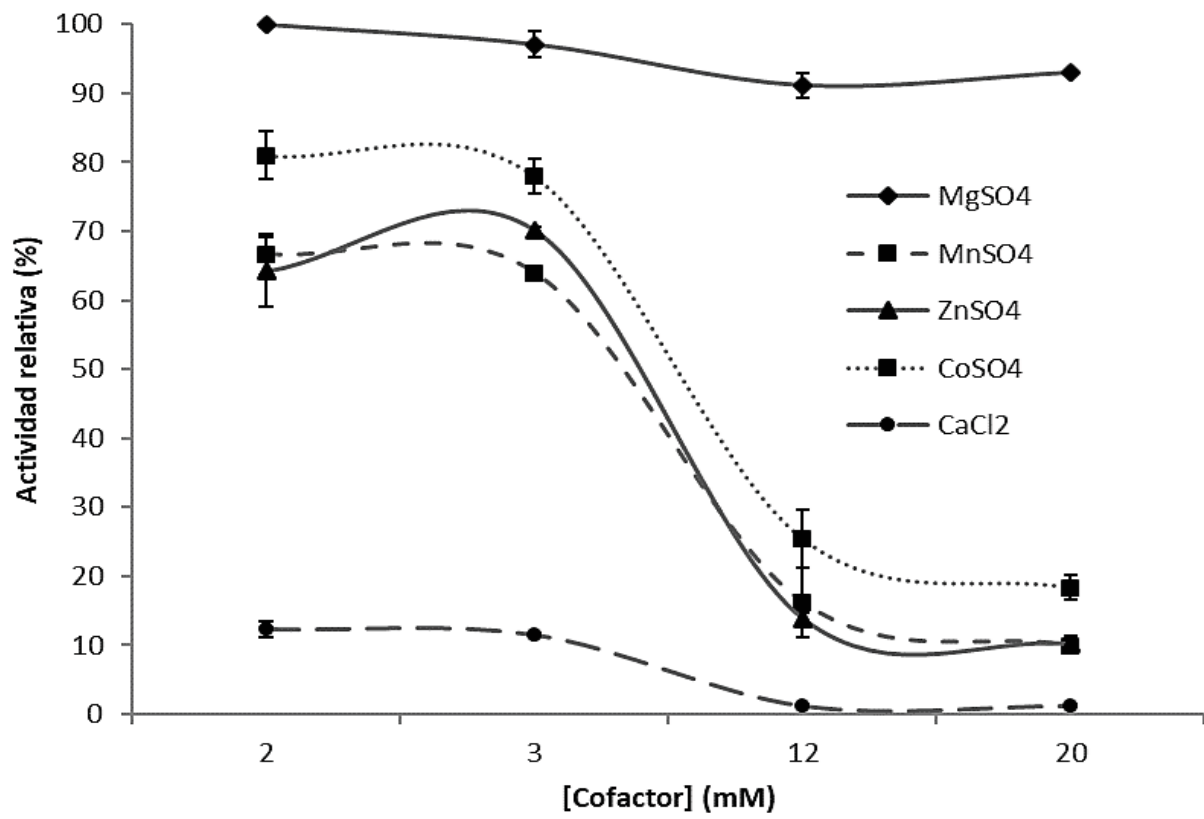


Fig. 6

Fig. 7



- ②① N.º solicitud: 202030228
②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.03.2020
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GOLC40.11/12/2019 [en línea][recuperado el 04/02/2021]. Recuperado de Internet <URL: http://www.uniprot.org/uniprot/GOLC40 > Todo el documento.	1-35
X	CAZ96627.27/03/2015 [en línea][recuperado el 04/02/2021]. Recuperado de Internet <URL: http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/CAZ96627 > Todo el documento.	1-35
A	DEL ARCO J et al. "Purine and Pyrimidine Phosphoribosyltransferases: A Versatile Tool for Enzymatic Synthesis of Nucleoside-5'-monophosphates." Current Pharmaceutical Design, 30/11/2016, Vol. 23, Páginas 6898-6912, ISSN 1381-6128(print) ISSN 1873-4286(electronic), <DOI: doi: 10.2174/1381612823666171017165707>. Todo el documento.	1-35
A	THOMAS FRANCOIS et al. "Characterization of the first alginolytic operons in a marine bacterium: from their emergence in marine Flavobacteriia to their independent transfers to marine Proteobacteria and human gut Bacteroides." Environmental microbiology, 31/08/2012, Vol. 14, Páginas 2379 - 2394, ISSN 1462-2920 (Electronic), <DOI: doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02751.x pubmed:22513138>. Todo el documento.	1-35
A	FRESCO-TABOADA A et al. "New insights on nucleoside 2'-deoxyribosyltransferases: a versatile biocatalyst for one-pot one-step synthesis of nucleoside analogs." Applied microbiology and biotechnology, 30/04/2013, Vol. 97, Páginas 3773 - 3785, ISSN 1432-0614 (Electronic), <DOI: doi: 10.1007/s00253-013-4816-y pubmed: 23529679>. Todo el documento.	1-35

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
18.02.2021

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N9/12 (2006.01)

C12N9/10 (2006.01)

C12P19/30 (2006.01)

C12R1/20 (2006.01)

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

C12N, C12P, C12R

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

EPODOC, WPI, EBI-EMBL SEQUENCE DATABASES