



Tesis Doctoral

SÍNTESIS DE ANÁLOGOS NUCLEOSÍDICOS POR DESAMINACIÓN BIOCATALÍTICA

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

Sergi Pérez Ozcáriz

Director: Dr. Rafael Montilla Arévalo

Noviembre 2022



Programa de Doctorado en Química Sostenible

Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I

Síntesis de Análogos Nucleosídicos por Desaminación Biocatalítica

Memoria presentada por Sergi Pérez Ozcáriz para optar al grado de
doctor por la Universitat Jaume I

El doctorando

Sergi Pérez Ozcáriz

El director

Dr. Rafael Montilla Arévalo

Castelló de la Plana, Noviembre de 2022

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS.

No se permite la copia ni reproducción por ningún soporte de los contenidos de este documento.

El trabajo presentado ha sido posible gracias al contrato laboral firmado con IUCT (grupo Inkemia) durante los años en que se ha desarrollado.

©2022

Sergi Pérez Ozcáriz

*“Si he podido ver más lejos
es porque he subido en hombros de gigantes”*

Isaac Newton

Dedicada a mi familia, Sara, Martí y Jana.

A mis padres y a mi hermano.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo presentado en esta tesis ha sido obra de muchas manos. Un trabajo coral, como lo son casi todas. Pero esta es la que me toca presentar a mí, por lo que me corresponde reconocer a cada una de las personas que, de alguna manera, han contribuido a que esta tesis pueda llegar a ver su final. No todas las colaboraciones han sido en forma de trabajo experimental o teórico directo, en muchos casos, las aportaciones han sido mucho más sutiles, en ayudarme a entender cuál es la mejor manera de hacer las cosas, en acompañarme en el descubrimiento de la grandeza y la belleza de las leyes naturales, o en animarme a no abandonar en algún punto del camino. De hecho, este tipo de aportaciones, más etéreas, son habitualmente las más difíciles de reconocer. En mi caso, además, mi paso por este programa de doctorado ha sido largo, por lo que en todo este tiempo han pasado muchas cosas tanto en mi vida profesional como personal. Todas esas cosas, así como las personas que me han acompañado en estos años, han contribuido en mayor o menor medida a que este documento haya llegado a existir.

Por empezar por lo más formal, desde luego, he de agradecer a todos mis compañeros de aventura su apoyo. Por un lado a mi grupo de la UJI por su acogida, especialmente al Dr. Santiago Luis, a quien jubilé, sospecho que hastiado de esperar, y a la Dra. Belén Altava por su paciencia y orientación. Pero también a todo el resto del equipo, tanto del departamento, como los docentes y compañeros del Máster que hicieron que mi paso por Castellón fuera realmente una vuelta a la ilusión por empezar un proyecto nuevo. Por otro lado, está toda la gente que me ha acompañado en Mollet durante una parte importante de mi vida. Mis compañeros y amigos que compartieron conmigo los años de IUCT. Muchas de estas personas han sido parte de mi familia durante años, así que solo por eso ya tienen parte de responsabilidad en lo que se presenta aquí, pero otras muchas han participado activamente en mi desarrollo como profesional y, específicamente, en el proyecto “de las desaminasas”. Expresamente quiero agradecer a la Dra. Marta Pascual, a Cristina López y al Dr. Javier Alonso por su implicación en este y otros tantos proyectos en lo que fue el grupo de *Drug Discovery*, junto al resto de compañeros que fueron pasando en las diferentes etapas. Asimismo, a la gente de *Biotech*, el Dr. Deroncelé, Carles, Laura, Marc (*el rabaso*) por sus contribuciones, confidencias, y alegrías. Especialmente al Dr. Rafael Montilla (*el Comandante*) quien me acompaña desde mucho antes de empezar con mi programa de doctorado. Él me convenció de empezar, y seguir, el camino que me ha llevado, entre otras cosas, a concluir este trabajo. A él

le quiero agradecer su confianza, apoyo y guía incondicional durante el trozo de vida que hemos compartido. Y sin más, a todo el resto de compañeros con quien compartí tantos años de risas y lloros, ya sean de administración, formación, servicios, etc... A Miguel, Javi, Fátima, Anna, Carme, David, Lorenzo, Isa, Meri, Juan, Paqui, y muchos más, a todos gracias por todo, y mucha suerte.

En la parte más difusa de sus contribuciones podría intentar citar a aquellas personas que, a lo largo de mi vida, me han acompañado hasta el día de hoy, compañeros de juegos y de juergas, de estudios, vecinos, etc... Pero en representación de todos ellos me limito a citar a los más relevantes, a mi familia natural, mis padres y hermano quienes siempre han confiado en mí y respetado mis decisiones, y a mi familia nueva, Sara, Martí y Jana, quienes, además de las evidentes alegrías y preocupaciones, me han forzado a solicitar todas las prórrogas posibles para la presentación de esta tesis por haberme entretenido en vivir.

A todos, gracias. Esto es un poquito vuestro.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	xiii
ABREVIACIONES	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	31
MATERIAL Y MÉTODOS	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES	185
BIBLIOGRAFÍA.....	189
ANEXOS	199
Anexo 1. Tabla resumen de las reacciones de síntesis	201
Anexo 2. Portada de la patente aprobada en Europa.....	203
Anexo 3. Portada de la patente aprobada en China	204

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas aplicaciones industriales de enzimas bacterianas ⁽²¹⁾	10
Tabla 2. Algunas aplicaciones industriales de enzimas de levaduras y de hongos filamentosos ⁽²¹⁾	10
Tabla 3. Primer nivel de clasificación enzimática según la Enzyme Commission	11
Tabla 4. Relación de compuestos aprobados pertenecientes al grupo de los análogos nucleosídicos	18
Tabla 5. Composición de los geles de agarosa para el análisis de ADN.	37
Tabla 6. Composición del tampón TAE utilizado en este trabajo	37
Tabla 7. Composición del medio McConkey, fórmula por litro.	38
Tabla 8. Condiciones para las PCRs de aislamiento de los genes <i>cdd</i> y <i>dcd</i> de <i>E. coli</i>	38
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes <i>cdd</i> y <i>dcd</i> de <i>E. coli</i>	39
Tabla 10. Composición del medio para el rastreo de transformantes.....	39
Tabla 11. Condiciones para las PCRs de comprobación de los recombinantes.....	40
Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para las PCRs de comprobación de recombinantes en pGEM-T Easy	40
Tabla 13. Condiciones de digestión para la recuperación de los genes de interés de pGEM.	41
Tabla 14. Condiciones de ligación de los genes de interés en pET22b(+)	41
Tabla 15. Condiciones para las PCRs de comprobación de los recombinantes de la construcción definitiva de los genes de interés en el vector pET22 b(+)	42
Tabla 16. Oligonucleótidos utilizados para las PCRs de comprobación de recombinantes en pET22 b(+).	42
Tabla 17. Composición de los geles SDS-PAGE para el análisis de proteínas.	43
Tabla 18. Composición del tampón de electroforesis SDS-PAGE utilizado en este trabajo.	44
Tabla 19. Receta estándar del medio TB utilizado para la fermentación de las proteínas recombinantes	44
Tabla 20. Receta del medio de alimentación para la fermentación en lote-alimentado	45
Tabla 21. Descripción de nucleósidos sustratos y patrones utilizados en esta fase del estudio.....	50
Tabla 22. Estructuras de los sustratos y productos de interés.....	50
Tabla 23. Gradiente de fase móvil en el método de HPLC.....	51
Tabla 24. Datos de tiempos de retención para sustrato, impureza y producto final con el método analítico facilitado por el cliente	52
Tabla 25. Parámetros más representativos de la productividad de EcoCDA en los tres cultivos de prueba en reactor en régimen de lote alimentado	73
Tabla 26. Resultados de actividad del estudio de estabilidad del catalizador expresados en % de recuperación por comparación con el primer punto del muestro	75
Tabla 27. Parámetros de reacción de los ensayos rx.5 a rx.9.....	80
Tabla 28. Parámetros de reacción de los ensayos rx.26 a rx.33	83
Tabla 29. Parámetros de reacción para los ensayos rx.34 a rx.45	86
Tabla 30. Resultados de actividad enzimática obtenidos a los 5 minutos en los ensayos de rx.34 a rx.45	86
Tabla 31. Parámetros de reacción para los ensayos rx.46 a rx.52	88
Tabla 32. Resultados de actividad enzimática obtenidos a los 10 minutos en los ensayos rx.46 a rx.52	89
Tabla 33. Parámetros de reacción para los ensayos rx.82 a rx.87.	91
Tabla 34. Parámetros de reacción para los ensayos rx.88 a rx.95	93
Tabla 35. Parámetros de reacción para los ensayos rx.96 a rx.109	96
Tabla 36. Resultados de actividad, precisión y reproducibilidad (ensayos rx.96 a rx.101, y rx.103 a rx.108)	98
Tabla 37. Resultados de conversión a 24 h de las diferentes pruebas de concepto.	99
Tabla 38. Resultados de solubilidad del intermedio 3.2 y del producto final en el medio de reacción.....	100
Tabla 39. Condiciones de las reacciones R9A1 a R9A4 para el estudio de la concentración de sustrato .	100

Tabla 40. Condiciones de las reacciones realizadas para el estudio de la estequiometría enzima / sustrato.....	102
Tabla 41. Evolución del pH durante la evolución de la reacción R9A12	105
Tabla 42. Evolución del pH durante la evolución de la reacción R9A11	107
Tabla 43. Solubilidad determinada experimentalmente del producto de partida y del producto final a 45°C.....	108
Tabla 44. Condiciones de las reacciones R9A1 y R9A7 realizadas a máxima concentración de sustrato.	108
Tabla 45. Condiciones de las reacciones R9A7 a R9A10, llevadas a cabo a 45°C.....	110
Tabla 46. Condiciones de las reacciones R9A7 y R9A15 para el estudio del uso de agua a 45°C como medio de reacción	111
Tabla 47. Condiciones de las reacciones R9A15 a R9A17 para el estudio de la estequiometría enzima / sustrato en agua a 45°C	113
Tabla 48. Evolución del pH durante el transcurso de las reacciones R9A15 a R9A17	114
Tabla 49. Impurezas detectadas formadas durante la reacción	115
Tabla 50. Condiciones de las reacciones R9A18 y R9A19 a sobresaturación de sustrato.....	117
Tabla 51. Condiciones de las reacciones R9A20 a R9A22 a sobresaturación de sustrato.	118
Tabla 52. Descripción de las impurezas detectadas en las reacciones de síntesis del sofosbuvir por HPLC	120
Tabla 53. Controles e impurezas formadas en los experimentos para evaluar la estabilidad química del sustrato.....	122
Tabla 54. Controles e impurezas formadas en los experimentos para evaluar la estabilidad del enzima.	123
Tabla 55. Controles e impurezas del estudio de la estabilidad química del sofosbuvir.	124
Tabla 56. Controles e impurezas del estudio de estabilidad enzimática del sofosbuvir.	124
Tabla 57. Diferentes t_R según el método utilizado de las impurezas en estudio.	126
Tabla 58. Cantidad y pureza de las impurezas aisladas.	127
Tabla 59. Resultados obtenidos de m/z y asignaciones en el análisis de la Impureza 3.	128
Tabla 60. Condiciones de las reacciones R9A23 y R9A24 en que se monitorizó el pH en continuo.	129
Tabla 61. Controles e impurezas de la R9A23 con monitorización pero sin corrección de pH.....	131
Tabla 62. Controles e impurezas de la R9A24 con monitorización y corrección de pH.....	134
Tabla 63. Condiciones de las reacciones R9A29 y R9A30 con control de pH	135
Tabla 64. Controles e impurezas de la R9A29 con monitorización y ajuste de pH entre 6,6 y 7,0	136
Tabla 65. Controles e impurezas de la R9A30 con monitorización y ajuste de pH entre 6,35 y 6,55	138
Tabla 66. Resumen de los pH monitorizados durante las reacciones R9A23, R9A24, R9A29 y R9A30 con los porcentajes correspondientes de las tres impurezas de proceso a estudio	139
Tabla 67. Equivalentes de enzima utilizados en las reacciones R9A25 a R9A28.	140
Tabla 68. Controles e impurezas de R9A32, reacción a sobresaturación de sustrato y control de pH.	144
Tabla 69. RT i RRT obtenidos para los 4 compuestos analizados.	148
Tabla 70. Tabla de controles e impurezas de estudio de la reacción R9A31	151
Tabla 71. Valores obtenidos de Impureza I en los diferentes controles de R9A31.	152
Tabla 72. Tabla resumen comparativa del porcentaje de sofosbuvir detectado en los controles de las reacciones R9A32 y R9A33	155
Tabla 73. Porcentaje de conversión corregida en los diferentes controles de la reacción R9A34.	157
Tabla 74. Valores de actividad enzimática del enzima en función del pH.	161
Tabla 75. Experimentos enfocados a la evaluación de utilizar un medio ácido desde el inicio de la reacción.	163
Tabla 76. Valores experimentales de solubilidad del producto de partida y del producto final a 45°C en agua con y sin MeOH como cosolvente.	165
Tabla 77. Valores experimentales de solubilidad del producto de partida y del producto final a 45°C en agua y en AcOEt.	167

Tabla 78. Impurezas detectadas en las reacciones R9A38 y R9A39. 172

ÍNDICE DE IMÁGENES

<i>Imagen 1. Estructuras de los nucleósidos canónicos que forman parte de los ácidos nucleicos</i>	17
<i>Imagen 2. Esquema general de la reacción de fosforólisis catalizada por enzimas del tipo NP⁽⁹⁹⁾</i>	26
<i>Imagen 3. Esquema general de síntesis de nucleósidos por transglicosilación mediada por combinación de enzimas tipo NP. Nótese que UP (uridina fosforilasa) y TP (timidina fosforilasa) son tipos de PyNP⁽⁹⁹⁾</i>	26
<i>Imagen 4. Esquema general de la reacción de síntesis de nucleósidos por transglicosilación mediada por enzimas tipo NDT⁽⁹⁹⁾</i>	27
<i>Imagen 5. Esquema general de una reacción de desaminación enzimática sobre un nucleósido</i>	28
<i>Imagen 6. Esquema general de la reacción de interés</i>	48
<i>Imagen 7. Curva de calibrado para el intermedio 3.2 según el método analítico por HPLC a 260 nm (en HPLC-04)</i>	52
<i>Imagen 8. Curva de calibrado para sofosbuvir según el método analítico por HPLC a 260 nm (en HPLC-04)</i>	53
<i>Imagen 9. Curva de calibrado para sofosbuvir según el método analítico por HPLC a 260 nm (en HPLC-01)</i>	53
<i>Imagen 10. Reacción objetivo del presente trabajo. Señalando la posición a desaminar enzimáticamente</i>	57
<i>Imagen 11. Reacción natural del enzima dCTP desaminasa</i>	57
<i>Imagen 12. Reacción natural del enzima dCTP desaminasa</i>	57
<i>Imagen 13. Reacción natural del enzima CDA</i>	57
<i>Imagen 14. Análisis electroforético del producto de PCR para el aislamiento del gen dcd de E. coli. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carril 1: marcador; Carril 2: producto de PCR.</i>	59
<i>Imagen 15. Análisis electroforético del producto de PCR para el aislamiento del gen cdd de E. coli. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carril 1: marcador; Carril 2: producto de PCR.</i>	59
<i>Imagen 16. Análisis electroforético de la digestión de los plásmidos extraídos de las colonias dcd_1 a dcd_12. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: geles. Carriles 1 y 16: marcador; Carril 2: digestión miniprep dcd_1; Carril 3: digestión miniprep dcd_2; Carril 4: digestión miniprep dcd_3; Carril 5: digestión miniprep dcd_4; Carril 6: digestión miniprep dcd_5; Carril 7: digestión miniprep dcd_6; Carriles 8 y 9: vacíos; Carril 10: digestión miniprep dcd_7; Carril 11: digestión miniprep dcd_8; Carril 12: digestión miniprep dcd_9; Carril 13: digestión miniprep dcd_10; Carril 14: digestión miniprep dcd_11; Carril 15: digestión miniprep dcd_12.</i>	60
<i>Imagen 17. Análisis electroforético de la digestión del plásmido extraído de la colonia cdd_1. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carriles 1 y 4: marcador; Carriles 2 y 3: producto de la doble digestión del plásmido con NdeI y BamHI.</i>	61
<i>Imagen 18. Análisis electroforético del producto de PCR para la confirmación de la inserción del gen dcd de E. coli en pET22 b(+). Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: geles. Carriles 1, 9, 17 y 32: marcador; Carril 2: PCR sobre dcd_22_1; Carril 3: PCR sobre dcd_22_2; Carril 4: PCR sobre dcd_22_3; Carril 5: PCR sobre dcd_22_4; Carril 6: PCR sobre dcd_22_5; Carril 7: PCR sobre dcd_22_6; Carril 8: PCR sobre dcd_22_7; Carril 10: PCR sobre dcd_22_8; Carril 11: PCR sobre dcd_22_9; Carril 12: PCR sobre dcd_22_10; Carril 13: PCR sobre dcd_22_11; Carril 14: PCR sobre dcd_22_12; Carril 15: PCR sobre dcd_22_13; Carril 16: PCR sobre dcd_22_14; Carril 18: PCR sobre dcd_22_15; Carril 19: PCR sobre dcd_22_16; Carril 20: PCR sobre dcd_22_17; Carril 21: PCR sobre dcd_22_18; Carril 22: PCR sobre dcd_22_19; Carril 23: PCR sobre dcd_22_20; Carril 24: PCR sobre dcd_22_21; Carril 25: PCR sobre dcd_22_22; Carril 26: PCR sobre dcd_22_23; Carril 27: PCR sobre dcd_22_24; Carril 28: PCR sobre</i>	

dcd_22_25; Carril 29: PCR sobre dcd_22_26; Carril 30: PCR sobre dcd_22_27; Carril 31: PCR sobre dcd_22_28.	62
Imagen 19. Análisis electroforético de las PCRs sobre las minipreps de las colonias que habían aparecido como positivas en el primer rastreo. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carril 1: marcador; Carril 2: PCR miniprep dcd_22_4; Carril 3: PCR miniprep dcd_22_9; Carril 4: PCR miniprep dcd_22_10; Carril 5: PCR miniprep dcd_22_19; Carril 6: PCR miniprep dcd_22_22; Carril 7: PCR miniprep dcd_22_26; Carril 8: PCR miniprep dcd_22_28.	62
Imagen 20. Alineamiento entre la secuencia obtenida del clonaje del gen dcd de E. coli y la secuencia publicada	63
Imagen 21. Análisis electroforético del producto de PCR para la confirmación de la inserción del gen cdd de E. coli en pET22 b(+). Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carril 1: producto de PCR; Carril 2: marcador.	64
Imagen 22. Alineamiento entre la secuencia obtenida del clonaje del gen cdd de E. coli y la secuencia publicada	65
Imagen 23. Inducción piloto de EcodCTPd. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carriles 1 y 4: marcador; Carril 2: C- de expresión a las 3 h post-inducción; Carril 3: EcodCTPd a las 3 h post-inducción.	66
Imagen 24. Inducción piloto de EcoCDA. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carril 1: marcador; Carril 2: C- de expresión a las 4 h post-inducción; Carril 3: EcoCDA a las 4 h post-inducción; Carril 4: C- de expresión O/N; Carril 5: EcoCDA O/N.	67
Imagen 25. Inducción de EcoCDA. Carril 1: C- de expresión a la 1 h post-inducción; Carril 2: EcoCDA a la 1 h post-inducción; Carril 3: C- de expresión a las 2 h post-inducción; Carril 4: EcoCDA a las 2 h post-inducción; Carril 5: C- de expresión a las 2,5 h post-inducción; Carril 6: EcoCDA a las 2,5 h post-inducción; Carril 7: C- de expresión a las 3 h post-inducción; Carril 8: EcoCDA a las 3 h post-inducción; Carril 9: SN sonificado del C- de expresión a las 3 h post-inducción; Carril 10: SN sonificado de EcoCDA a las 3 h post-inducción.	68
Imagen 26. Representación de la reacción probada en condiciones de PoC con la enzima EcodCTP	68
Imagen 27. Representación de la reacción tipo establecida para la enzima EcodCTP	69
Imagen 28. Análisis SDS-PAGE de las pruebas de precipitación fraccionada. Carriles 1 y 10: vacíos; Carriles 2, 5, 7 y 10: Marcador de peso molecular; Carril 3: Pellet precipitación con 20% de (NH ₄) ₂ SO ₄ ; Carril 4: Pellet precipitación con 30% de (NH ₄) ₂ SO ₄ ; Carril 6: SN precipitación con 20% de (NH ₄) ₂ SO ₄ ; Carril 8: SN precipitación con 30% de (NH ₄) ₂ SO ₄	70
Imagen 29. Gráfico de control de uno de los cultivos en biorreactor en que se puede apreciar la evolución de la agitación, el oxígeno disuelto y los flujos de aire y de oxígeno puro. Se indica con una flecha el momento en que acabó la fase den batch y se inició la fase de alimentación e inducción.	74
Imagen 30. Recta patrón para dU con el método analítico optimizado	76
Imagen 31. Representación de la actividad enzimática del extracto a lo largo del tiempo cuando la concentración de proteína total en la reacción es de 5 µg/ml	78
Imagen 32. Representación de la actividad a lo largo del tiempo cuando la concentración de proteína total en la reacción era de 1 µg/ml (rx.3) o de 0,5 µg/ml (rx.4)	79
Imagen 33. Representación de la formación de dU a lo largo del tiempo cuando la concentración de proteína total en la reacción es de 1 µg/ml (rx.3) o de 0,5 µg/ml (rx.4).....	79
Imagen 34. Representación de la actividad a lo largo del tiempo cuando la concentración de proteína total en la reacción fue de 0,5 µg/ml (rx.5), de 0,2 µg/ml (rx.6), de 0,1 µg/ml (rx.7), de 0,05 µg/ml (rx.8) o de 0,02 µg/ml (rx.9).....	81
Imagen 35. Representación de la formación de dU a lo largo del tiempo cuando la concentración de proteína total en la reacción fue de 0,5 µg/ml (rx.5), de 0,2 µg/ml (rx.6), de 0,1 µg/ml (rx.7), de 0,05 µg/ml (rx.8) o de 0,02 µg/ml (rx.9).....	82
Imagen 36. Representación de la formación de dU a lo largo del tiempo en los experimentos rx.26 a rx.33	84

<i>Imagen 37. Representación de la actividad a lo largo del tiempo en los ensayos rx.26 a rx.33</i>	84
<i>Imagen 38. Representación de la formación de dU a lo largo del tiempo en los ensayos rx.44 (18 mM dC y 0,2 µg/ml) y rx.45 (18 mM y 0,4 µg/ml)</i>	87
<i>Imagen 39. Representación de la formación de dU a lo largo del tiempo en los ensayos rx.46 (0,4 µg/ml), rx.47 (0,2 µg/ml) y rx.48 (0,1 µg/ml)</i>	89
<i>Imagen 40. Representación de la actividad a lo largo del tiempo en los ensayos rx.46, rx.47 y rx.48</i>	90
<i>Imagen 41. . Representación de la actividad a lo largo del tiempo en los ensayos rx.82 y rx.83 (0,4 µg/ml), rx.84 y rx.85 (0,2 µg/ml), rx.86 y rx.87 (0,1 µg/ml)</i>	92
<i>Imagen 42. Representación de la formación de dU a lo largo del tiempo en los ensayos rx.82 y rx.83 (0,4 µg/ml), rx.84 y rx.85 (0,2 µg/ml), rx.86 y rx.87 (0,1 µg/ml)</i>	92
<i>Imagen 43. Representación de la actividad a lo largo del tiempo en los ensayos rx.88 y rx.89 (0,4 µg/ml), rx.90 y rx.91 (0,8 µg/ml), rx.92 y rx.93 (1,6 µg/ml), rx.94 y rx.95 (2,5 µg/ml)</i>	94
<i>Imagen 44. Representación de los µmoles formados de dU a lo largo del tiempo en los ensayos rx.88 y rx.89 (0,4 µg/ml), rx.90 y rx.91 (0,8 µg/ml), rx.92 y rx.93 (1,6 µg/ml), rx.94 y rx.95 (2,5 µg/ml)</i>	94
<i>Imagen 45. Representación de la actividad a lo largo del tiempo en los ensayos rx.102 y rx.109</i>	97
<i>Imagen 46. Representación de los µmoles formados de dU a lo largo del tiempo en los ensayos rx.102 y rx.109</i>	97
<i>Imagen 47. Estudio del efecto de la concentración de sustrato sobre el perfil cinético de la reacción</i>	101
<i>Imagen 48. Estudio del efecto de la estequiometría enzima/sustrato sobre el perfil cinético de la reacción</i>	102
<i>Imagen 49. Estudio del efecto del cambio de tampón: de tampón fosfato (R9A1) a tampón bicarbonato (R9A12)</i>	104
<i>Imagen 50. Estudio del efecto del cambio de tampón: de tampón fosfato (R9A1) a agua desionizada en medio no tamponado (R9A11)</i>	106
<i>Imagen 51. Estudio del efecto de la temperatura y la concentración de sustrato en el medio</i>	109
<i>Imagen 52. Estudio combinado del efecto de la estequiometría enzima/sustrato a 45°C y saturación de sustrato, con 1 equivalente (R9A7), 2 equivalentes (R9A8), 2,5 equivalentes y 3 equivalentes (R9A10) de enzima</i>	110
<i>Imagen 53. Comparativa entre los perfiles de reacción llevadas a cabo a 45°C con 1 equivalente de enzima a saturación de sustrato en tampón fosfato (R9A7) y a 45°C con un equivalente de enzima a saturación de sustrato en agua sin tamponar (R9A15)</i>	112
<i>Imagen 54. Reacciones llevadas a cabo a 45°C con 1 equivalente de enzima a saturación de sustrato en agua (R9A15), a 45°C con 2,5 equivalentes de enzima a saturación de sustrato en agua (R9A16) y a 45°C con 3 equivalentes de enzima a saturación de sustrato en agua (R9A17)</i>	113
<i>Imagen 55. Reacción de desaminación del intermedio 3.2 para la obtención de sofosbuvir</i>	116
<i>Imagen 56. Comparativa del perfil de reacción a concentración de sustrato superior a su solubilidad máxima, en iguales condiciones de reacción (45°C y 3 equivalentes de enzima)</i>	117
<i>Imagen 57. Comparativa del perfil de reacción a concentración de sustrato superior a su solubilidad máxima, en iguales condiciones de reacción (45°C y 2 equivalentes de enzima)</i>	119
<i>Imagen 58. Ejemplo de cromatograma donde se observan las impurezas generadas durante la reacción</i>	121
<i>Imagen 59. Cromatograma de la reacción R9A22 a 46 h</i>	125
<i>Imagen 60. Potencial estructura molecular atribuible a la impureza 3</i>	128
<i>Imagen 61. Evolución del pH en medio no regulado</i>	129
<i>Imagen 62. Evolución de la reacción en medio sin ajuste de pH, comparando valores de conversión (%) y sofosbuvir formado (%), respectivamente, así como porcentaje de área de HPLC para las tres impurezas mayoritarias</i>	130
<i>Imagen 63. Cromatograma del control de reacción de R9A24 a 7,5h</i>	132
<i>Imagen 64. Evolución del pH en medio ajustado entre 7,1 y 7,5</i>	132

<i>Imagen 65. Evolución de la reacción con el ajuste de pH entre 7 y 7, 5 aproximadamente, comparando valores de conversión (%) y sofosbuvir formado (%), así como el porcentaje de área de HPLC para las tres impurezas mayoritarias. Puede observarse como su presencia disminuye significativamente</i>	<i>133</i>
<i>Imagen 66. Ampliación de la proporción y evolución de las principales impurezas en función del progreso de la reacción R9A24</i>	<i>133</i>
<i>Imagen 67. Evolución del pH en medio ajustado entre 6,6 y 7,0.....</i>	<i>135</i>
<i>Imagen 68. Evolución de la reacción con el ajuste de pH entre 6,6 y 7, 0 aproximadamente, comparando valores de conversión (%) y sofosbuvir formado (%), así como porcentaje de área de HPLC para las tres impurezas, en porcentajes inferiores a 0,67%</i>	<i>135</i>
<i>Imagen 69. Ampliación de la proporción y evolución de las principales impurezas en función del progreso de la reacción</i>	<i>136</i>
<i>Imagen 70. Evolución del pH en medio ajustado entre 6,35 y 6,55.....</i>	<i>137</i>
<i>Imagen 71. Evolución de la reacción con el ajuste de pH entre 6,35 y 6,55 aproximadamente, comparando valores de conversión (%) y sofosbuvir formado (%), así como el porcentaje de área de HPLC para las tres impurezas, en porcentajes inferiores a 0,5%</i>	<i>137</i>
<i>Imagen 72. Ampliación de la proporción y evolución de las principales impurezas en función del progreso de la reacción</i>	<i>138</i>
<i>Imagen 73. Evolución de la conversión en los diferentes ensayos de ajuste de pH.....</i>	<i>139</i>
<i>Imagen 74. Rango de ajuste de pH de los diferentes ensayos realizados</i>	<i>140</i>
<i>Imagen 75. Evolución de la conversión de los cuatro experimentos realizados en el estudio combinado del efecto agua como medio de reacción y estequiometría enzima/sustrato (II) a 45°C.....</i>	<i>141</i>
<i>Imagen 76. Evolución del pH en medio ajustado entre 6,35 y 6,55.....</i>	<i>142</i>
<i>Imagen 77. Evolución de la reacción con el ajuste de pH entre 6,35y 6,55 aproximadamente, comparando valores de conversión (%) y sofosbuvir formado (%) según bases de cálculo, así como porcentaje de área de HPLC para las tres impurezas, en porcentajes inferiores a 0,9%</i>	<i>143</i>
<i>Imagen 78. Ampliación de la proporción y evolución de las principales impurezas en función del progreso de la reacción</i>	<i>144</i>
<i>Imagen 79. Análisis del contenido de las fracciones generadas durante el ensayo de work-up</i>	<i>146</i>
<i>Imagen 80. Cromatograma del intermedio 3.2 obtenido a través de la ruta no infrigente</i>	<i>147</i>
<i>Imagen 81. Sustratos y productos finales del ensayo de estereoselectividad del enzima</i>	<i>148</i>
<i>Imagen 82. Ampliación del cromatograma del control de reacción de R9A31 a 7,5 h.....</i>	<i>149</i>
<i>Imagen 83. Evolución del pH en medio ajustado entre 6,35 y 6,55 en la reacción R9A31</i>	<i>150</i>
<i>Imagen 84. Evolución de la reacción con el ajuste de pH entre 6,35y 6,55 aproximadamente, comparando valores de conversión (%) y sofosbuvir formado (%), así como porcentaje de área de HPLC para las tres impurezas, en porcentajes inferiores a 0,5%.....</i>	<i>150</i>
<i>Imagen 85. Ampliación de la proporción y evolución de las principales impurezas en función del progreso de la reacción</i>	<i>151</i>
<i>Imagen 86. Evolución del pH en el medio de reacción.....</i>	<i>153</i>
<i>Imagen 87. Evolución de la reacción por comparativa entre resultados obtenidos con el lote de enzima 150417 (en R9A32) respecto del lote de enzima 05-USP-P01 en (R9A33), y representación de sofosbuvir formado en R9A33.....</i>	<i>154</i>
<i>Imagen 88. Evolución comparativa de las reacciones R9A33 y R9A34.....</i>	<i>157</i>
<i>Imagen 89. Evolución de la reacción R9A35.....</i>	<i>160</i>
<i>Imagen 90. Efecto de la presencia de cosolventes orgánicos en la determinación de actividad del enzima (el valor del 100% corresponde a la actividad enzimática en las condiciones estándar, es decir, en medio acuoso tamponado y ausencia de solventes orgánicos). La medida se realiza a 5 minutos de tiempo de contacto.....</i>	<i>164</i>
<i>Imagen 91. Efecto de la presencia de 10% de MeOH en la evolución de la reacción</i>	<i>166</i>
<i>Imagen 92. Efecto de la presencia de AcOEt en el medio sobre la evolución de la reacción</i>	<i>168</i>

<i>Imagen 93. Comparativa perfiles de reacción R9A38 y R9A39 (conversión total acumulada de sofosbuvir)</i>	170
<i>Imagen 94. Comparativa perfiles de reacción R9A38 y R9A39 (corrección de la conversión de sofosbuvir formado de novo)</i>	171
<i>Imagen 95. Cromatograma HPLC del crudo de reacción R10A1</i>	174
<i>Imagen 96. Comparativa perfiles de reacción R9A38 y R9A40 (la flecha indica el momento en el que se ha añadido la cantidad adicional de enzima hasta completar los 1,15 eq deseados)</i>	175
<i>Imagen 97. Comparativa perfiles de reacción R9A38 con R9A40 y R9A41</i>	177
<i>Imagen 98. Cromatograma HPLC del experimento R10A2 a los 30 minutos de reacción</i>	179
<i>Imagen 99. Metodología de work-up tipo 1. Se ha tomado como referencia la reacción R9A35. P: porcentaje en peso relativo (sof/intermedio); V: Valoración (assay)</i>	181
<i>Imagen 100. Metodología de work-up tipo 2. Se ha tomado como referencia la reacción R9A38. P: porcentaje en peso relativo (sof/intermedio); V: Valoración (assay)</i>	182
<i>Imagen 101. Metodología de work-up tipo 3. Se ha tomado como referencia la reacción R9A41. P: porcentaje en peso relativo (sof/intermedio); V: Valoración (assay)</i>	183

ABREVIACIONES

En este trabajo, además de las abreviaciones habituales para las unidades, se han utilizado las indicadas a continuación.

AcOEt: Acetato de etilo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

API: Principio activo farmacéutico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATP: Adenosín trifosfato.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

cdd: Gen que codifica para la citidina desaminasa.

csp.: Cantidad suficiente para.

Da: Daltons.

dcd: Gen que codifica para la desoxicitidina trifosfato desaminasa.

dC: 2'-Desoxicitidina.

dCMP: 2'-Desoxicitidina monofosfato.

dCTP: 2'-Desoxicitidina trifosfato.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato (desoxirribonucleótido trifosfato).

dU: 2'-Desoxiuridina.

EC: *Enzyme Commission*. También hace referencia al número que dicha comisión asigna a cada enzima.

EcoCDA: Biocatalizador citidina desaminasa de *Escherichia coli*.

EcodCTPd: Biocatalizador desoxicitidina trifosfato desaminasa de *Escherichia coli*.

FDA: *United States of America Food & Drug Administration*.

FM: Fase móvil.

FR: Factor de respuesta.

FTO: *Freedom To Operate*.

GRAS: Generalmente reconocidos como seguros.

HPLC: Cromatografía líquida de altas prestaciones.

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.

kDa: Kilodaltons.

K.O.: *Knock Out*.

kpb: Kilopares de bases.

MeOH: Metanol.

NA: Análogo de nucleósido.

N-DRT: NDT.

NDT: N-Desoxirribosiltransferasa.

NP: Nucleósido fosforilasa.

NTP: Nucleótido trifosfato (Ribonucleótido trifosfato).

O/N: *Overnight*.

pb: Pares de bases.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDO: Propanodiol. En este trabajo, específicamente 1,3-propanodiol.

PNP: Purin nucleósido fosforilasa.

PoC: Prueba de concepto.

PPM: Fosfopentomutasa.

PyNP: Pirimidin nucleósido fosforilasa.

RK: Riboquinasa.

RCF: Fuerza centrífuga relativa, equivalente a fuerza-g o gravedades.

Rpm: Revoluciones por minuto.

RRT: Tiempo de retención relativo.

RT: Temperatura ambiente.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, desnaturizante.

S/N: Sobrenadante (de una centrifugación).

TEMED: Tetrametiletilendiamina.

TP: Timidina fosforilasa.

tr: Tiempo de retención.

UA: Unidades de actividad (enzimáticas).

UP: Uridina fosforilasa.

X-GAL: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

INTRODUCCIÓN

Química verde y biocatalizadores

Durante una buena parte del siglo XX, la industria química fue percibida por la sociedad como un símbolo de progreso y bienestar. La producción de fertilizantes y pesticidas permitió la recuperación económica de potencias que habían quedado empobrecidas con las guerras mundiales, el desarrollo de la industria farmacéutica supuso una mejora sustancial de la calidad de vida de una parte importante de la población mundial, la industria petroquímica generó riqueza y abasteció de combustible a particulares e industrias, y el desarrollo de la química de materiales revolucionó y acompañó al desarrollo de la sociedad de consumo occidental.

Sin embargo, esta visión optimista de la industria química sufrió una deriva durante la segunda mitad del siglo XX en una parte importante de la sociedad. Esta deriva, que todavía continúa en la actualidad, ha llevado a que la química sea vista como una industria sucia, peligrosa, que únicamente busca enriquecerse a costa de la salud de las personas y del medio ambiente. Actualmente hay movimientos sociales que buscan un consumo “libre de químicos”, productos sin conservantes, cosméticos “naturales”, combustibles renovables, incluso medicinas tradicionales o alternativas ⁽¹⁻⁵⁾. En este cambio de paradigma han influido muchos factores, siendo algunos de ellos externos a la industria química en sí misma, pero algunos de tales factores sí son atribuibles a la propia actividad de la industria. Catástrofes tales como la explosión de Bhopal en la que murieron miles de personas, accidentes de barcos petroleros, o la degradación del medio ambiente y el calentamiento global del planeta son sin duda argumentos de peso que han contribuido notablemente a este cambio de percepción social sobre la importancia y el papel de la industria química en la sociedad actual.

A pesar de lo dicho, es innegable que la industria química es, y seguirá siendo, indispensable en la sociedad, hasta el punto que es imposible imaginar una sociedad humana sin ella o llega a ser incluso un sinsentido hablar de una vida “libre de químicos”. Desde este punto de vista, parece claro que la industria química debe reinventarse para, efectivamente, ser más sostenible y menos peligrosa. Este cambio de enfoque no puede perseguir únicamente conseguir volver a tener una percepción positiva por parte de la sociedad, más bien debe ser realizado por un convencimiento interno y sincero de que una química más segura y menos contaminante es necesaria en un momento en que el planeta se enfrenta a retos importantes como el aumento constante de la población y el acceso por parte de cada vez más países a los estándares de las sociedades de consumo occidentales.

En este marco, a finales de los años 90, Paul Anastas y John Warner fueron pioneros en intentar definir cómo debería ser esta nueva química ⁽⁶⁻⁸⁾. Ellos entendieron que no es posible una sociedad sin química pero que, de la misma manera, la química debía redefinir algunas de sus bases para poder ser sostenible y compatible con el desarrollo económico y social. Ellos supieron ver que tal cambio se debe dar desde la propia disciplina química, desde la investigación hasta la instauración de los procesos industriales. Imaginaron una química más segura y cuyos procesos y productos son menos contaminantes, dando lugar al nacimiento de lo que se conoce como Química Verde.

Desde que Anastas y Warner publicaron su clásico libro ⁽⁹⁾ a finales del siglo pasado, los doce principios enunciados en su cuarto capítulo se han convertido en paradigmáticos.

1. Prevención. Es mejor evitar la formación de residuos que tratarlos o limpiarlos después de que se hayan formado.
2. Economía atómica. Los métodos de síntesis deberían diseñarse para maximizar la incorporación de todos los materiales utilizados en el producto final.
3. Síntesis químicas menos peligrosas. Siempre que sea posible, las metodologías sintéticas deberían diseñarse para usar y generar sustancias con poca o ninguna toxicidad para la salud humana y el medio ambiente.
4. Diseño de productos químicos seguros. Los productos químicos deberían diseñarse para mantener la eficacia de su función, a la vez que reducen su toxicidad.
5. Empleo de disolventes y reactivos auxiliares seguros. El empleo de sustancias auxiliares (como disolventes, agentes de separación, etc.) debería evitarse en lo posible, y ser inocuo cuando se empleen.
6. Diseño para la eficiencia energética. El impacto medioambiental y económico de los requerimientos energéticos debe ser reconocido y minimizado. Los métodos sintéticos deberían aplicarse a presión y temperatura ambiente.
7. Empleo de materias primas renovables. Deben utilizarse materias primas renovables siempre que sea técnica y económicamente viable.
8. Reducción de las derivatizaciones. La derivatización innecesaria (grupos bloqueadores, etapas de protección/desprotección, modificaciones temporales) debe evitarse en la medida de lo posible.

9. Priorización de los procesos catalíticos a los estequiométricos. Los reactivos catalíticos (tan selectivos como sea posible) son superiores a los reactivos estequiométricos.
10. Diseño para la degradación. Los productos químicos deben diseñarse de forma que al final de su función no persistan en el entorno y se degraden en productos inocuos.
11. Análisis a tiempo real. Deben desarrollarse metodologías analíticas que permitan el seguimiento y control de procesos en tiempo real, antes de que se formen sustancias peligrosas.
12. Minimización de los riesgos de accidentes químicos. Las sustancias químicas y las formas en que se usan dichas sustancias en un proceso químico deben escogerse para minimizar el potencial de accidentes químicos, incluyendo vertidos, explosiones e incendios.

Estos doce principios que pretenden servir de guía para ayudar a una nueva química más sostenible, respetuosa, segura y, por extensión, mejor percibida por la sociedad, parecen en cierta manera inspirados por la naturaleza. A lo largo de la evolución de la vida en la Tierra, los procesos biológicos han tendido a cumplir muchos de estos principios. Así pues, parece evidente que desde las disciplinas de las ciencias de vida se puede aportar mucho a la reconciliación de la industria química con la sociedad. Concretamente la biotecnología, por definición, intenta conseguir bienes o servicios utilizando seres vivos o partes de ellos, por ejemplo enzimas. En este sentido, el uso de enzimas como catalizadores en procesos sintéticos puede colaborar en unos cuantos de los principios descritos para conseguir una química más sostenible.

La humanidad ha utilizado los enzimas durante miles de años en forma de fermentaciones para conseguir la producción o preservación de ciertos alimentos como el queso, yogur, vinagre, pan, vino o cerveza. A pesar de que los procesos fermentativos no suelen considerarse estrictamente como biocatálisis, en definitiva todos los procesos biológicos son o dependen de reacciones químicas catalizadas por enzimas.

A mediados del siglo XIX, Louis Pasteur sentó un importante hito para la química enzimática desarrollando una resolución cinética en la cual trataba en solución acuosa una mezcla

racémica de ácido tartárico con un cultivo del hongo *Penicillium glaucum*, el cual consumía únicamente el enantiómero (+) y consiguiendo así un enriquecimiento del enantiómero (-) ⁽¹⁰⁾. Unos años más tarde, a finales del XIX, Eduard Buchner reportó que era posible la fermentación de azúcar usando extractos acelulares de levadura, demostrando así que para conseguir ciertas biotransformaciones no son necesarias las células vivas ⁽¹¹⁾.

Ya durante la primera mitad del siglo XX se empezó a explorar, tanto en universidades como en la industria, la nueva biocatálisis en la que se usaron fermentaciones con células enteras, extractos, o enzimas parcialmente purificados, para conseguir un amplio abanico de productos tanto quirales como aquirales.

Desde estos principios, el uso de enzimas por parte de los químicos para llevar a cabo reacciones de síntesis orgánica ha experimentado un crecimiento extraordinario, llegando a desarrollarse la biocatálisis no únicamente como una disciplina académica si no también penetrando en diferentes sectores industriales.

Sin embargo, desde el principio de su uso, los enzimas utilizados como biocatalizadores en síntesis orgánica han adolecido de dos inconvenientes principales ^(12, 13):

- Su disponibilidad en grandes cantidades tales que permitan su uso industrial, ya que tradicionalmente los enzimas se han obtenido por extracción de fuentes naturales, bien en forma de extractos o de enzimas purificados. Habitualmente la cantidad de un determinado enzima en su organismo de origen es baja, entre otros motivos por la propia naturaleza catalítica de estos. Aunque en ciertos casos la elevada actividad de algunos enzimas ha podido suplir este inconveniente, en la mayoría de los casos un uso que vaya enfocado a una aplicación industrial requiere grandes cantidades de enzima y, por extensión, de organismo fuente.
- En ciertos casos, su estrecho rango de reconocimiento de sustratos. Los enzimas han evolucionado durante miles de años para realizar una determinada función, esto es, catalizar una reacción específica. Sin embargo, para ciertas aplicaciones industriales, la reacción que se pretende catalizar no es la reacción sobre el sustrato natural al que se ha adaptado el enzima que se pretende usar. Muy a menudo, se pretende utilizar un enzima para catalizar una reacción sobre sustratos no naturales, y este tipo de reacciones puede presentar problemas de reconocimiento, de inhibición o de bajas cinéticas de reacción.

Estos dos inconvenientes se han ido superando poco a poco en las últimas décadas. El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante desde finales de los años 70 ha permitido la producción tanto a escala de laboratorio como a escala industrial de enzimas útiles para la química sintética, principalmente con aplicación en entorno farmacéutico y en química industrial^(13, 14). Esta tecnología permite producir una proteína de interés, tal como un enzima, en grandes cantidades de manera controlada sin tener que recurrir a la extracción de las fuentes naturales. En segundo lugar, el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular y de modelización molecular ha permitido desde los años 90 la adaptación y mejora de enzimas naturales para resolver problemas concretos en rutas sintéticas de productos de interés. Estas técnicas han permitido la ingeniería de los enzimas por evolución dirigida, mutación por saturación, barajado de genes o mutación aleatoria y selección de alto rendimiento, entre otras⁽¹²⁻¹⁵⁾.

Biocatálisis e industria

Hasta la fecha, miles de enzimas han sido descritos con diferente aplicabilidad en industria. Aunque los campos descritos de aplicación teóricos de la biocatálisis son prácticamente la totalidad de las disciplinas químicas, ha sido sin duda el ámbito farmacéutico dónde han despertado mayor interés, tanto por sus posibilidades técnicas como por su compatibilidad de escala de producción y capacidad para asumir el coste del proceso. A pesar de ello, hay toda una serie de requerimientos que deben ser satisfechos más allá de la propia operatividad del enzima. Es decir, que no basta con que un determinado enzima sea capaz de llevar a cabo una reacción concreta para que esto concluya con un proceso real, industrializable, económicamente rentable, y capaz, finalmente, de trasladar todos los beneficios de la biocatálisis a la sociedad.

Algunos de estos requerimientos tienen que ver con la viabilidad económica del proceso, parámetro fundamental para las empresas, tales como las concentraciones de producto y el coste del enzima en el proceso. En cuanto a las concentraciones de producto obtenido, normalmente se espera que se muevan entre los valores habituales en los procesos químicos tradicionales de, por lo menos, 50-100 g/l. Teniendo en cuenta que los enzimas trabajan en las células a concentraciones milimolares no siempre es fácil alcanzar los objetivos indicados. Sin embargo, la ingeniería de proteínas y el desarrollo de procesos pueden ayudar a alcanzar dichos niveles de productos sin inhibición de la actividad enzimática en ciertos casos. En cuanto al coste del enzima, suele expresarse como “gramo de producto/gramo del biocatalizador” y esta métrica debería alcanzar como mínimo un valor de 1.000 para enzimas

purificados y de 15 para un sistema de células enteras. Aunque, por supuesto, estos valores son generalizaciones y debe considerarse cada caso particular dado que el precio de las materias primas o de los productos puede acabar determinando la viabilidad o no de un determinado proceso en ciertos casos, incluso por encima del precio que pueda alcanzar el enzima en sí mismo. En cualquier caso, hay ciertas soluciones que pueden ser consideradas de manera general, como la inmovilización de los enzimas de alguna manera que permita fácilmente su recuperación al final del proceso y su reutilización, además de permitir una mejor recuperación de productos ⁽¹⁶⁾.

Otros requerimientos que debe contemplar la industria farmacéutica sí están más relacionados con aspectos técnicos necesarios para la implementación del proceso, como es el caso de la posición del paso biocatalítico en la ruta sintética. La biocatálisis se suele utilizar para resolver o para crear uno o más centros quirales. Dado que esto puede hacerse en condiciones suaves y de manera selectiva, este paso suele estar presente en las últimas etapas del proceso de síntesis. Sin embargo, procesos biocatalíticos en estas últimas etapas pueden requerir ulteriores pasos de limpieza para asegurar que no quedan restos biológicos no deseados, como ácidos nucleídos, endotoxinas o restos de proteínas en el producto.

Teniendo de nuevo en consideración la capacidad enzimática de síntesis asimétrica, es fácil relacionarla con el hecho de que cada vez con más asiduidad los nuevos fármacos aprobados presenten por lo menos un centro quiral. Dado que la regulación de la FDA exige que se demuestre que el isómero no terapéutico no sea teratogénico, es preferible que la síntesis de los compuestos quirales sea en una única forma isomérica ⁽¹⁷⁾. Además, el tamaño y la complejidad crecientes de estas moléculas a menudo resultan en múltiples centros quirales. Por lo tanto, la razón principal para el uso de biocatalizadores en reacciones de síntesis es explotar sus propiedades de regio- y enantioselectividad, ya que, incluso en compuestos no naturales, se pueden obtener elevadas purezas evitando el diseño de complicadas síntesis tradicionales ⁽¹⁸⁾. El objetivo para un proceso industrial es que haya un exceso enantiomérico de, por lo menos, un 98%. Claro que si este límite no se alcanza en un primer paso se puede ir enriqueciendo posteriormente en procesos de reprocesado o de purificación.

Otro aspecto importante en la implementación de un paso enzimático en un proceso de desarrollo farmacéutico es la necesidad de optimizar los procesos de manera rápida. El sector farmacéutico necesita explotar al máximo la vida útil de sus patentes, así que habitualmente las primeras síntesis de productos destinados a estudios de eficacia y toxicidad, o incluso a las primeras fases clínicas, suelen ser rutas subóptimas que permiten la producción de cantidad

suficiente de API para los primeros lotes piloto pero que no tienen demasiado en cuenta los aspectos económicos del proceso. Sin embargo, llega un momento en que, si el candidato a fármaco en cuestión progresa en la cascada del desarrollo, sí deben considerarse los aspectos de la optimización de los procesos productivos. La química de un compuesto puede llegar a variar radicalmente desde las primeras etapas de un desarrollo farmacéutico hasta la ruta comercial. De igual manera que esto es habitual para los procesos químicos tradicionales, también lo es para los procesos biocatalíticos. En las primeras fases, enzimas naturales o comerciales pueden usarse para determinar si un proceso es o no factible, pero llegado el momento de la explotación comercial, muy probablemente este enzima habrá tenido que ser mejorado para la optimización del paso biocatalítico. Sin embargo, así como para la química convencional las acciones para mejorar una reacción concreta pueden estar más o menos bien establecidas, la evolución de un enzima es un proceso casi titánico que pasa por mucho trabajo experimental y para el que, aún hoy, las predicciones *in silico* en las que se puede apoyar son modestas. Por todo ello, el desarrollo de cada proceso es, en sí mismo, un reto, y a contrarreloj si se está en un entorno farmacéutico ^(15, 19, 20).

Más allá de las ventajas que puede aportar un proceso biocatalítico para una producción industrial respecto a un proceso tradicional, hay que destacar que también dentro del mundo de los biocatalizadores se pueden encontrar grandes diferencias entre enzimas, no sólo por su operatividad, sino también por la capacidad de ser suministrados a escala industrial. En este sentido, el desarrollo de enzimas industriales ha dependido significativamente del uso de enzimas microbianos. Los microbios son útiles porque se pueden producir de manera económica en fermentaciones cortas, en medios baratos, su rastreo es simple y la mejora de las cepas para conseguir producciones con mayor rendimiento ha sido muy exitosa. En las décadas de los años 80 y 90 del siglo pasado muchos enzimas microbianos reemplazaron a enzimas de animales o de plantas en multitud de aplicaciones industriales, incluyendo productos de alimentación (humana y animal), detergentes, textil, tratamiento de pieles, industria papelera, o enzimas para diagnóstico y terapia ⁽²¹⁻²³⁾. Además de los enzimas microbianos naturales, el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, tuvo un enorme impacto en los niveles de producción de enzimas a escala mundial, ya que se han podido producir a gran escala multitud de enzimas, independientemente de la especie de origen, en cepas microbianas industriales. Esta tecnología ha sido rápidamente aceptada por la industria porque puede aumentar cientos de veces la productividad de un enzima respecto a sus niveles naturales y porque permite la producción de enzimas de cepas no adecuadas para la industria en cepas industriales. Más del 50% de los enzimas presentes en el mercado son enzimas

recombinantes. En muchos casos estos enzimas se han usado para sustituir rutas de síntesis química. El aumento del uso de enzimas en industria ha implicado tanto el uso de enzimas aislados purificados o semipurificados como el uso de células enteras para llevar a cabo bioconversiones ⁽²¹⁾.

En términos económicos, el mercado de enzimas a nivel industrial pasó de unos 1.600 millones de dólares en 1998 a 5.100 millones de dólares en 2009 ⁽²¹⁾. Algunas de las aplicaciones para estos enzimas se muestran en la Tabla 1 y la Tabla 2.

Tabla 1. Algunas aplicaciones industriales de enzimas bacterianos ⁽²¹⁾

Enzyme	Source (genus)	Application
α -Amylase	<i>Bacillus</i>	Baking industry
Asparaginase	<i>Escherichia</i>	Pharmaceutical
Cellulase	<i>Clostridium</i>	Plant waste treatment
Dextranase	<i>Leuconostoc</i>	Pharmaceutical
Glucose isomerase	<i>Bacillus</i>	Fructose syrup
Oxidoreductases	<i>Bacillus</i>	Food, detergents
Penicillin amidase	<i>Bacillus</i>	Pharmaceutical
Penicillin acylase	<i>Escherichia</i>	Pharmaceutical
Protease	<i>Bacillus</i>	Laundry, detergents
Pullulanase	<i>Klebsiella</i>	Baking
Subtilisin	<i>Bacillus</i>	Pharmaceutical, detergents

Tabla 2. Algunas aplicaciones industriales de enzimas de levaduras y de hongos filamentosos ⁽²¹⁾

Enzyme	Source (genus)	Application
α -Amylase	<i>Aspergillus</i>	Baking
Catalase	<i>Aspergillus</i>	Food
Cellulase	<i>Aspergillus</i>	Waste, textiles
Dextranase	<i>Penicillium</i>	Food
Phytase	<i>Aspergillus</i>	Feed
Glucose oxidase	<i>Aspergillus</i>	Food
α -galactosidase	<i>Saccharomyce</i>	Dairy
Invertase	<i>Kluyveromyces</i>	Food
Naringinase	<i>Penicillium</i>	Food
Lactase	<i>Aspergillus</i>	Dairy
Lipase	<i>Rhizopus, Candida</i>	Food
Rennin	<i>Mucor</i>	Cheese
Pectinase	<i>Aspergillus</i>	Drinks
Protease	<i>Aspergillus</i>	Baking
Xylanase	<i>Aspergillus</i>	Food, Paper

La *International Union of Biochemistry*, a través de la *Enzyme Commission*, clasifica todos los enzimas conocidos en siete grupos según el tipo de reacción que catalizan (ver Tabla 3). Cada grupo está dividido en subgrupos y estos a su vez también lo están y así hasta un total de cuatro niveles jerárquicos ⁽²⁴⁾.

Tabla 3. Primer nivel de clasificación enzimática según la Enzyme Commission

Grupo	Reacción que catalizan
EC 1 Oxidorreductasas	Reacciones de oxidación/reducción y de transferencia de átomos de H, O, o electrones desde una sustancia a otra.
EC 2 Transferasas	Transferencia de un grupo funcional desde una sustancia a otra. El grupo puede ser metil-, acil-, amino- o fosfato.
EC 3 Hidrolasas	Formación de dos productos a partir de un sustrato mediante hidrólisis.
EC 4 Liasas	Adición o eliminación no hidrolítica de grupos de los sustratos. Pueden romper los enlaces C-C, C-N, C-O o C-S
EC 5 Isomerasas	Isomerización de una molécula.
EC 6 Ligasas	Unión de dos moléculas por síntesis de nuevos enlaces C-O, C-S, C-N o C-C con la rotura simultánea de ATP.
EC 7 Traslocasas	Impulsión de iones o moléculas a través de membranas.

Cada uno de estos niveles jerárquicos está identificado con un número, asignado por la *Enzyme Commission*, conocido como número EC. Por ejemplo, el enzima “cocaína esterasa” recibe el número EC 3.1.1.84 construido de la siguiente manera:

3 por hidrolasa

3.1 por ser una hidrolasa que actúa sobre enlaces tipo éster

3.1.1 por actuar sobre ésteres carboxílicos

3.1.1.84 por ser capaz de hidrolizar la cocaína en éster metílico de ecgonina y benzoato, diferenciándola así del resto de hidrolasas que puedan actuar sobre otros ésteres carboxílicos

A pesar de lo concreto de esta clasificación, no debe entenderse que sólo hay un enzima capaz de llevar a cabo esta reacción. Este enzima en concreto está descrito tanto en humanos como en ciertas bacterias. En todos los casos le corresponde el mismo código EC, sin embargo, debido a que la evolución puede haber llevado a casos de evolución divergente, los enzimas que están incluidos en la misma clasificación pero que provienen de fuentes diferentes pueden

tener diferencias significativas entre sí, tanto de secuencia aminoacídica, como de estructura tridimensional, como de reconocimiento de sustratos, o diferencias cinéticas. Aunque, si llevan a cabo la misma reacción natural, el mecanismo de reacción debe ser común ya que no hay que olvidar que, al fin y al cabo, los enzimas son catalizadores químicos y, por tanto, se rigen por la misma química que catalizadores no biológicos. Pero el hecho de que exista esta diversidad para un mismo enzima (un mismo tipo de enzimas definido por un único número EC) permite, en un proceso industrial, poder rastrear cuál de los enzimas disponibles puede resultar más útil para una conversión concreta ya que, aunque todos los enzimas pertenecientes a un grupo común catalicen la misma reacción natural, muchas de las reacciones de interés industrial implican sustratos no naturales que pueden ser mejor o peor reconocidos por dichos enzimas. Como se ha comentado, los biocatalizadores pueden utilizarse en diferentes formas, esto es, bien en forma de extractos celulares con la actividad catalítica de interés, bien en forma de enzimas parcial o totalmente purificados, bien como células enteras, o incluso como catalizadores soportados elaborados a partir de cualquiera de dichas formas. Todas estas presentaciones aportan ventajas e inconvenientes ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

Con mucha diferencia, el uso de células enteras es el formato más sencillo y económico. Su aplicación se puede ejecutar haciendo crecer la cepa de interés directamente en presencia del sustrato a modificar y, mientras la cepa crece en el fermentador, la bioconversión se va llevando a cabo. Una vez acabada la fermentación se debe proceder al aislamiento del producto de interés, en caso que esto sea necesario. La técnica se puede sofisticar si primero se cultivan las células y, una vez crecidas, en forma no proliferante se aplican al reactor en el que se va a llevar a cabo la bioconversión. En este segundo caso el comportamiento del proceso se asimila más a una reacción catalizada mientras que en el primero se suele conocer como fermentación.

En el caso de no usar las células enteras para ejecutar la bioconversión se pueden lisar estas células por diferentes medios, obteniendo así un extracto complejo enriquecido con el enzima de interés. Este extracto puede clarificarse separando la fracción soluble de la insoluble, por centrifugación o por filtración, y recuperar la fracción de interés, que habitualmente será la soluble. Cualquiera de estos tipos de extractos contiene un abundante número de tipos de biomoléculas de origen celular, tanto proteínas, como ácidos nucleicos, azúcares, lípidos, vitaminas, entre otros, así como restos que puedan quedar del medio de cultivo. Todos estos contaminantes pueden, en algunos casos, interferir en la reacción de interés bien por aparición de reacciones competitivas no deseadas, bien por la generación de otras impurezas en el proceso.

Cuando se requiere un catalizador con un mayor valor añadido, entendido como mayor pureza que conlleve un menor perfil de impurezas en la reacción y una mayor reproducibilidad del proceso, se debe valorar la posibilidad de añadir al proceso de producción del catalizador algún paso de purificación de la proteína para eliminar parte de las moléculas acompañantes indeseadas. Estos pasos de purificación pueden ser de muy diversa naturaleza, sin embargo, a la hora de encarar un proceso industrializable hay que ser muy cuidadoso con el método a escoger para evitar que los costes de producción se salgan de presupuesto, incluso en campos de productos con un alto valor en el mercado, como puede ser el ámbito farmacéutico. Así pues, se intenta simplificar al máximo los procesos de purificación enzimática, favoreciendo aquellos que sean baratos y fácilmente escalables, como la precipitación por salado o los choques térmicos cuando sean factibles, frente a aquellos que, aunque gocen de buena y merecida fama en entornos más académicos, son más caros o incompatibles con el entorno industrial, como la cromatografía o la ultracentrifugación. Evidentemente el proceso de purificación de un enzima puede ser totalmente diferente en cada caso y puede incluir uno o varios pasos de purificación que deberán escogerse en función del destino que vaya a tener el biocatalizador, pero como norma general puede considerarse que la purificación de enzimas para la industria debe ser la mínima que ofrezca resultados aceptables. Nótese que un proceso de purificación de un enzima es comparable a un *work-up* químico tradicional que pretende separar el analito de interés del resto del crudo y que disminuye el rendimiento en cada paso.

Por otra parte, la inmovilización del catalizador sobre algún tipo de soporte puede aportar ventajas al proceso biocatalítico tales como facilidad en la recuperación del catalizador, para ser reutilizado en próximas reacciones y para facilitar la purificación de los productos de la reacción tras la biocatálisis, o posibilitar la adaptación del proceso de síntesis a ingenierías poco habituales en catálisis homogénea, como procesos en continuo. La inmovilización puede realizarse tanto con células enteras, como con extractos crudos o parcialmente purificados, como con enzimas purificados a homogeneidad.

Sea cual sea el formato de catalizador escogido para llevar a cabo un proceso biocatalítico o quimioenzimático, igual que en los procesos químicos tradicionales, hay ciertas consideraciones que se deben tener en cuenta a la hora de escalar un proceso, tales como la elección del reactor, siendo el tanque agitado el más utilizado por su sencillez de uso y versatilidad, sin embargo hay que tener en cuenta otras posibilidades como reactores de lecho empaquetado que pueden permitir configuraciones de reacción en continuo para obtener mayores productividades; sistemas de control de pH, ya que la ventana operativa de un

biocatalizador puede ser muy estrecha en algunos casos; o el uso de ciertos co-solventes, que cuando se pretende trabajar a gran escala se deben priorizar aquellos que son GRAS ^(19, 25).

En resumen, cuando se escala un proceso biocatalítico a la industria puede pasar que el proceso final se parezca poco al desarrollado en laboratorio. Algunas de las consideraciones a tener en cuenta son comunes a los procesos químicos convencionales, mientras que otras están relacionadas con la naturaleza biocatalítica del proceso ^(25, 28).

Muchos son ya los casos de éxitos de procesos biocatalíticos industriales, uno de los mejores conocidos es el caso del 1,3-propanodiol (PDO). Este compuesto es componente de nuevos polímeros con excelentes propiedades para la industria textil. Para la síntesis del PDO se han descrito varias rutas sintéticas, sin embargo, sólo dos se llevan a cabo a escala industrial; la de Degussa/DuPont es una ruta en dos pasos que parte de la acroleína que se hidrata a 3-hidroxi-propanal (3-HPA), el cual es hidrogenado catalíticamente a PDO; la segunda ruta es la de Shell que, también en dos pasos, parte del óxido de etileno que es carbonilado con monóxido de carbono e hidrógeno a 3-HPA, el cual también se hidrogena a PDO. Estas rutas químicas presentan algunos inconvenientes serios como son rendimientos moderados, necesidad de altas presiones y temperatura, catalizadores caros y generación de intermedios tóxicos. Por todo ello, la producción del PDO ha sido un objetivo de interés para multitud de intentos de desarrollo de procesos biocatalíticos. DuPont y Genencor International, Inc. han conseguido exitosamente ingenierizar una cepa de *Escherichia coli* capaz de producir PDO por fermentación partiendo de glucosa. Sin embargo, a consecuencia del enorme exceso de glicerol producido como subproducto en la industria del biodiesel, otras iniciativas han intentado modificar cepas mediante ingeniería metabólica para producir el PDO partiendo del glicerol. De esta manera se pretende revalorizar un subproducto residual disminuyendo así la contaminación y ayudando a que ambos procesos sean más rentables, el del biodiesel porque puede reutilizar sus residuos que de esta manera dejan de serlo, y el proceso de producción de PDO porque puede partir de una materia prima barata ⁽²⁹⁾.

Se encuentran en la literatura otros casos de éxito sobre la producción de compuestos plataforma que pueden servir para sustituir materias primas provenientes del petróleo por otras de origen fermentativo, como es caso del ácido succínico o del adípico entre otros, u otras moléculas con actividad biológica como la Sitagliptina o la Cefalexina ⁽³⁰⁾.

Muchos enzimas pueden operar a temperatura ambiente, en condiciones acuosas neutras y en ausencia de protección de grupos funcionales. En síntesis orgánica, estos biocatalizadores pueden utilizarse como único catalizador de la reacción, en combinación con otros enzimas, o

con reactivos no biológicos. La naturaleza quiral de los enzimas favorece la síntesis de compuestos con regio- y estereo-especificidades definidas. En muchos casos los enzimas son capaces de reconocer sustratos no naturales y, además, la ingeniería genética/enzimática puede permitir mejorar sus propiedades tales como estabilidad, especificidad por sustrato, o incrementar su actividad. El uso de enzimas puede, no sólo mejorar ciertas reacciones, sino permitir modificaciones específicas en moléculas que, por su complejidad, no pueden ser modificadas por métodos químicos tradicionales. Así pues, el uso de enzimas en química industrial o farmacéutica representa una oportunidad para el desarrollo de nuevos procesos ⁽¹⁴⁾. Como ejemplo, el uso de xilanasas es utilizado a escala industrial desde hace un par de décadas en diferentes sectores, tales como la industria papelera, donde dicha enzima ayuda a reducir el uso de procesos más agresivos para la elaboración de la pulpa de papel evitando el uso de cloro para su blanqueamiento; en alimentación veterinaria, donde se utilizan como aditivo alimentario, como en alimentación humana, en la que se usan como clarificadores de zumos; o incluso en otros sectores de la química industrial en los que se utilizan en procesos de desgomado de fibras vegetales como el cáñamo, el lino, el yute o el ramio ⁽³¹⁾.

En la obtención de enzimas para su uso en industria, se puede partir de fuentes naturales, pero esta vía puede tener ciertas limitaciones, principalmente en aspectos de productividad, aunque también puede ser en otros aspectos tales como el reconocimiento de sustratos y las condiciones de operación. Una alternativa es la producción recombinante de los enzimas de interés, la cual puede facilitar la obtención de tales enzimas tanto en su forma nativa como en formas evolucionadas de estos enzimas. Esta producción recombinante, a su vez, también presenta algunas dificultades para su uso, principalmente en aspectos de aceptación por el mercado, en función del sector al que se intenten dirigir, pero para aplicaciones en el ámbito de la salud, suele ser la opción preferida.

Nucleósidos y análogos de nucleósidos

Como se ha comentado anteriormente, la industria que más ha profundizado en el uso de enzimas como catalizadores químicos de alto valor es la industria farmacéutica. En este sentido cabe mencionar que existe un grupo importante de fármacos con aplicaciones tanto antivirales y como anticancerígenas que derivan de moléculas naturales conocidas como nucleósidos ⁽³²⁻⁴¹⁾.

Los nucleósidos naturales son moléculas compuestas por un azúcar ciclado y una base nitrogenada unida por un enlace *N*-glucosídico a la posición 1' del azúcar. Adicionalmente,

pueden estar enlazados en 5' con un grupo mono-, di-, o trifosfato, tomando entonces el nombre de nucleótidos o nucleósidos organofosforados.

Los nucleósidos y nucleótidos son compuestos presentes en todas las células y en todos los organismos y tienen una enorme importancia biológica por diferentes motivos ^(42, 43):

- Son los constituyentes elementales de los ácidos nucleicos.
- Son intermediarios metabólicos presentes en reacciones que generan o consumen energía, actuando como reservorio de esta.
- Algunos actúan como mediadores en las rutas de señalización química celular.
- Forman parte de coenzimas o vitaminas.

El azúcar que los compone es una pentosa, siendo esta la ribosa (β -D-ribofuranosa) o la 2'-desoxirribosa (β -D-2'-desoxirribosa).

Las bases nitrogenadas presentes en nucleósidos y nucleótidos naturales se incluyen un grupo reducido representado por cinco moléculas principales que pueden ser clasificadas en dos grupos según su estructura, (imagen 1):

- Bases púricas: derivan de la purina y son, principalmente, la adenina (A) y la guanina (G).
- Bases pirimidínicas: derivan de la pirimidina y son, principalmente, la citosina (C), la timina (T) y el uracilo (U).

En su función de componentes de los ácidos nucleicos, en el ácido ribonucleico (ARN) siempre estará presente la ribosa como azúcar y A, G, C y U como bases nitrogenadas. Mientras que en el ácido desoxirribonucleico (ADN) el azúcar que lo compone es la desoxirribosa y las bases son A, G, C y T. Tanto en las cadenas poliméricas de ARN como de ADN los grupos fosfato sirven de puente entre los diferentes nucleótidos (ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) que se unen mediante la formación de enlaces fosfodiéster entre los carbonos 5' y 3' de nucleótidos consecutivos.

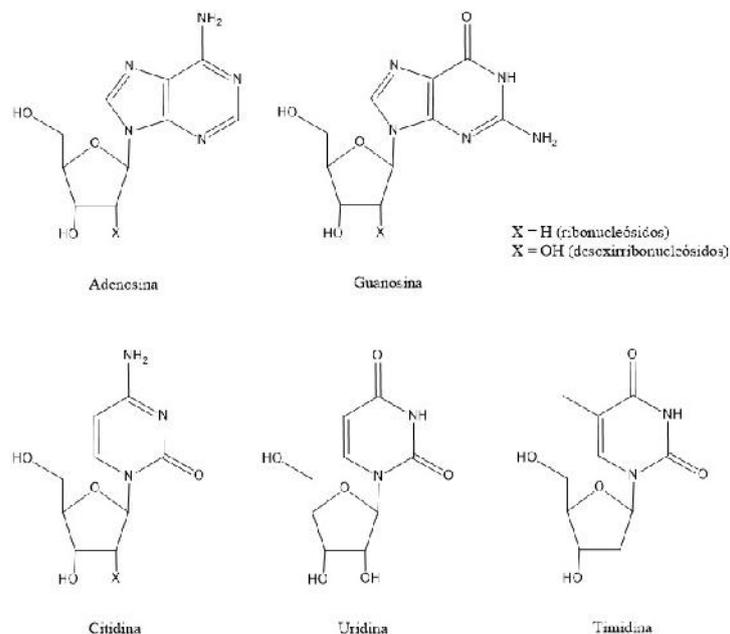


Imagen 1. Estructuras de los nucleósidos canónicos que forman parte de los ácidos nucleicos

Sobre la base de la estructura natural de los nucleósidos se han realizado multitud de modificaciones, tanto en la base nitrogenada como en el azúcar, obteniéndose así los derivados artificiales de los nucleósidos o análogos nucleosídicos, algunos de los cuales se han demostrado como fármacos muy eficaces para diferentes indicaciones terapéuticas. Tales modificaciones incluyen la modificación de la estereoquímica, la incorporación o eliminación de heteroátomos, la exploración de diferentes sustituyentes o hasta la apertura del anillo del azúcar. Estos compuestos derivados de nucleósidos naturales, conocidos como análogos nucleosídicos, cumplen su función en el interior de la célula donde, principalmente, interfieren con la replicación de los ácidos nucleicos tras ser fosforilados a las formas tri-fosfato, las cuales son las formas activas, cosa que explica su actividad en células que están replicándose activamente.

Durante las décadas de los '60 y los '70 del siglo anterior hubo un interés considerable en la síntesis de análogos nucleosídicos con heteroátomos. De todos ellos, se demostró que los más efectivos fueron los thio- nucleósidos. Muchos otros análogos nucleosídicos han sido sintetizados con diferentes modificaciones en el anillo del azúcar o en la base con aplicaciones como antibacterianos, antivirales y anticancerígenos ^(31-36, 44).

Un grupo particular de derivados nucleosídicos son aquellos que han sido diseñados para actuar como profármacos para facilitar sus propiedades farmacocinéticas, intentando conseguir una vía de administración oral. Para conseguir tal fin se han intentado diferentes aproximaciones que pasan por disminuir la polaridad de los compuestos mediante la

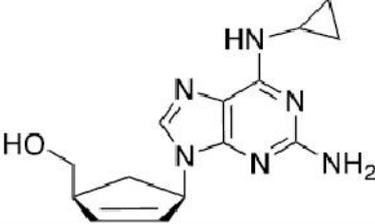
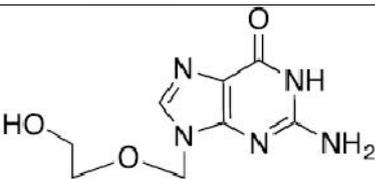
esterificación de cadenas alifáticas, las cuales facilitan la absorción intestinal y son eliminadas por la acción de esterasas dentro del organismo, liberando el compuesto parental para que pueda penetrar dentro de las células⁽³⁸⁾.

Dentro de los profármacos, hay un subgrupo de especial importancia conocido como ProTides (*pro-nucleotides*) que porta una estructura organofosforada en 5' modificada. Estos compuestos están diseñados para mejorar la absorción del compuesto y su potencia respecto al fármaco parental, aunque no todos se pueden administrar por vía oral. En cualquier caso, su estructura facilita su entrada dentro de la célula independientemente de los canales de entrada de nucleósidos y, dentro de la célula, son desprotegidos y activados a una forma monofosfato del nucleótido, lo que facilita su fosforilación a las formas di- y tri-fosfato respectivamente.

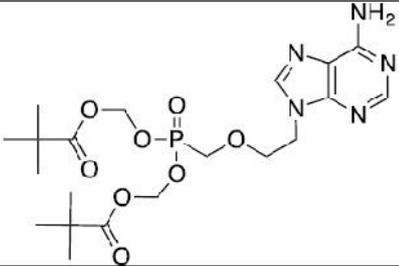
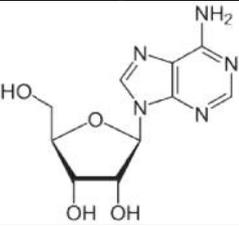
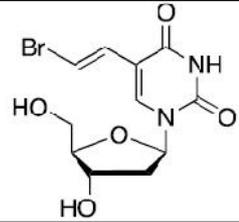
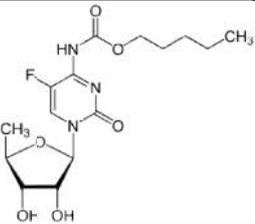
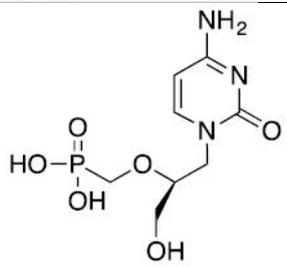
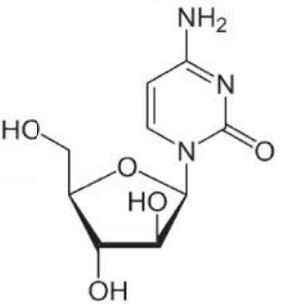
Actualmente hay decenas de compuestos pertenecientes al grupo de los análogos nucleosídicos cuyo uso como fármacos está aprobado por las agencias reguladoras internacionales y, a pesar de que son un grupo de compuestos bastante estudiado, siguen apareciendo nuevas aprobaciones para compuestos de este tipo como ha pasado recientemente con la lucha contra el SARS-CoV-2, virus para el que se aprobó en 2021 como tratamiento el Molnupiravir de Merck y otros nucleósidos fueron ensayados con mayor o menor repercusión mediática, como el Remdesivir de Gilead.

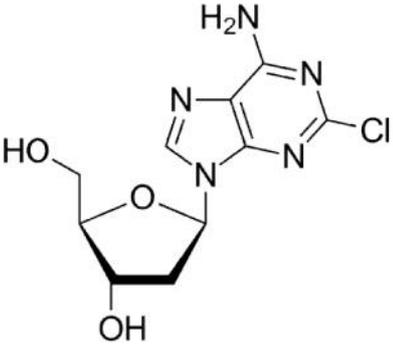
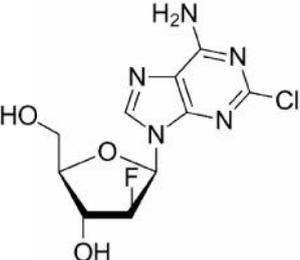
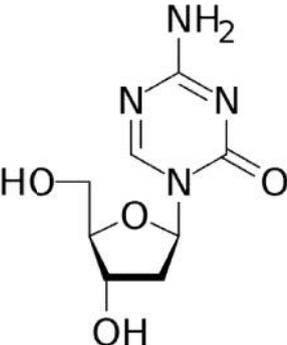
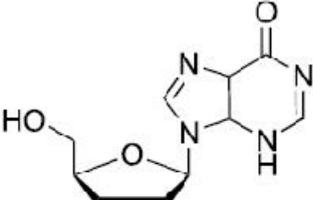
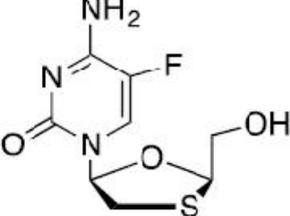
En la siguiente tabla se muestran los compuestos y sus indicaciones aprobadas.

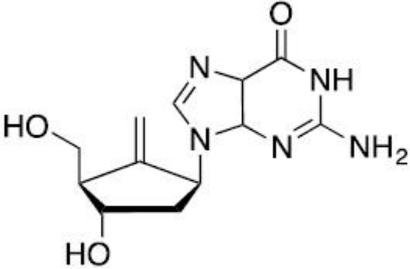
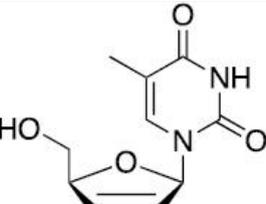
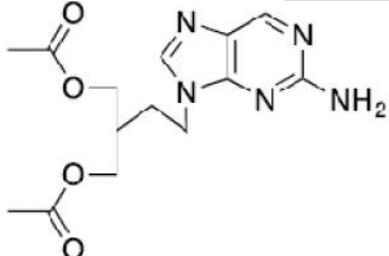
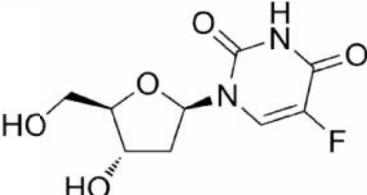
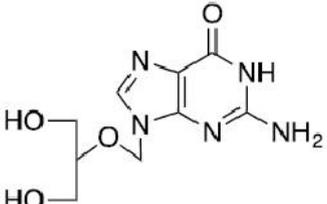
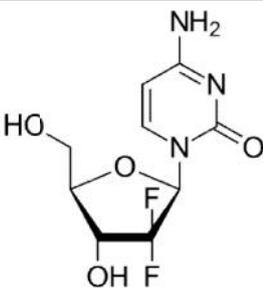
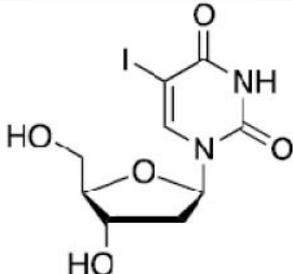
Tabla 4. Relación de compuestos aprobados pertenecientes al grupo de los análogos nucleosídicos¹

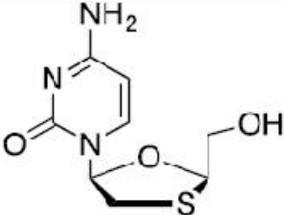
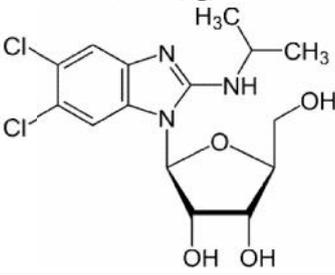
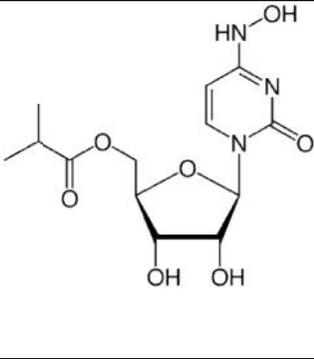
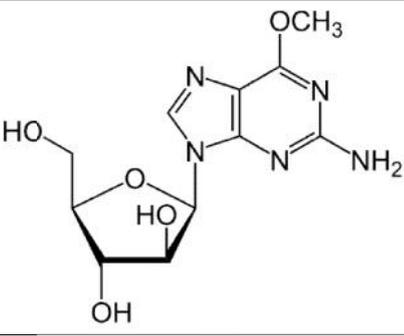
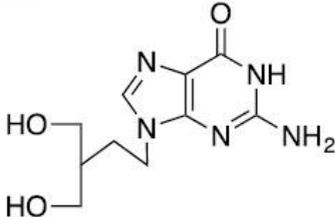
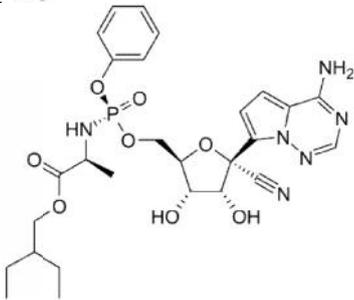
Compuesto	Estructura	Uso aprobado
Abacavir		Abacavir es un inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosido antiviral que se usa en combinación con otros antirretrovirales para el tratamiento del VIH.
Aciclovir		El aciclovir es un análogo de la guanosina que se usa para tratar el herpes simple, la varicela zoster y el herpes zoster.

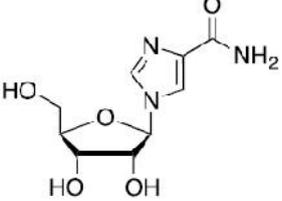
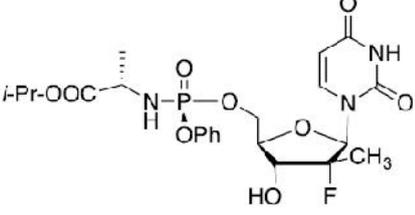
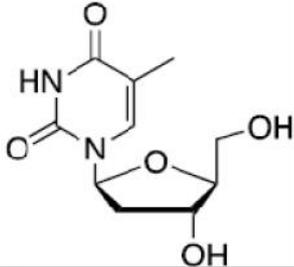
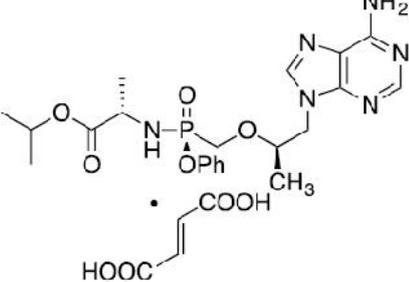
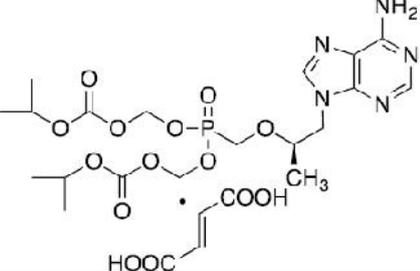
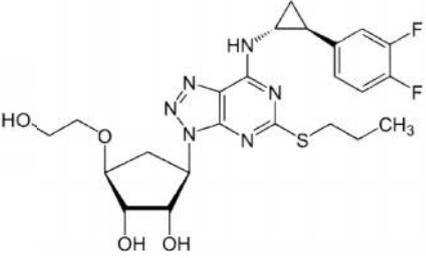
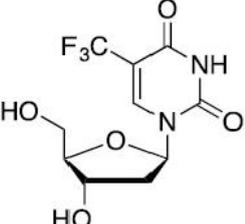
¹ Nótese que la Adenosina no es un análogo nucleosídico, es uno de los nucleósidos naturales.

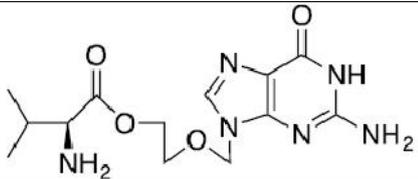
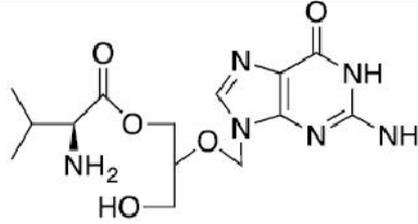
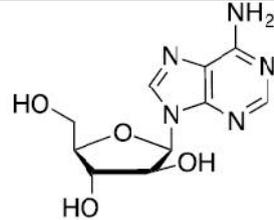
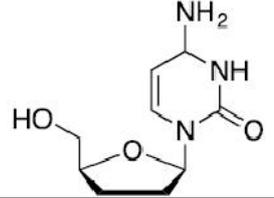
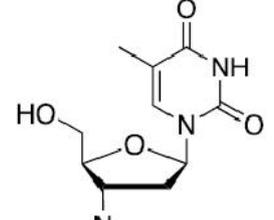
Adefovir dipivoxil		Adefovir dipivoxil es un análogo de nucleótido utilizado para tratar la hepatitis B crónica.
Adenosina		La adenosina es un medicamento utilizado en la gammagrafía de perfusión miocárdica y para tratar la taquicardia supraventricular.
Brivudina		La brivudina es un medicamento que se usa para tratar el herpes zóster.
Capecitabina		La capecitabina es un inhibidor metabólico nucleosídico indicado para tratar el cáncer de colon, colorrectal y de mama.
Cidofovir		El cidofovir es un agente antiviral que se usa para tratar la retinitis por citomegalovirus (CMV) en pacientes con SIDA.
Citarabina		La citarabina es un análogo nucleosídico de pirimidina que se usa para tratar la leucemia no linfocítica aguda, la leucemia linfocítica y la fase blástica de la leucemia mielocítica crónica.

Cladribina		<p>La cladribina es un antimetabolito de purina que se usa actualmente para el tratamiento de las formas recurrentes de esclerosis múltiple (EM), que se usa en pacientes que no han respondido o que no pudieron tolerar los medicamentos alternativos para la EM. Asimismo, también está indicado como agente antineoplásico utilizado en el tratamiento de enfermedades linfoproliferativas, incluida la leucemia de células pilosas.</p>
Clofarabina		<p>La clofarabina es un nucleósido de purina que se usa para tratar la leucemia linfoblástica aguda recidivante o refractaria en pacientes de 1 a 21 años.</p>
Decitabina		<p>La decitabina es un análogo de nucleósido de pirimidina quimioterapéutico que se utiliza para el tratamiento de los síndromes mielodisplásicos (SMD) al inducir la hipometilación del ADN y las alteraciones correspondientes en la expresión génica.</p>
Didanosina		<p>La didanosina es un inhibidor de la transcriptasa inversa que se usa para tratar el VIH.</p>
Emtricitabina		<p>La emtricitabina es un nucleósido inhibidor de la transcriptasa inversa que se utiliza para el tratamiento y la profilaxis del VIH.</p>

Entecavir		Entecavir es un análogo de nucleósido que se utiliza en el tratamiento de la hepatitis B crónica en pacientes con replicación viral activa, evidencia histológica de enfermedad activa o elevaciones persistentes de las transaminasas hepáticas.
Estavudina		La estavudina es un didesoxinucleósido utilizado en el tratamiento de la infección por VIH.
Famciclovir		Famciclovir es un inhibidor de la polimerasa de ADN análogo de nucleósido que se utiliza para el tratamiento del herpes labial y genital recurrente en pacientes sanos y pacientes con VIH, y para controlar el herpes zóster.
Floxuridina		La floxuridina es un antimetabolito utilizado como tratamiento paliativo para las metástasis hepáticas de neoplasias malignas gastrointestinales.
Ganciclovir		El ganciclovir es un inhibidor de la ADN polimerasa que se usa para tratar el citomegalovirus y la queratitis herpética del ojo.
Gemcitabina		La gemcitabina es un inhibidor metabólico nucleosídico que se usa como terapia adjunta en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer de ovario, carcinoma de pulmón no microcítico, cáncer de mama metastásico y como agente único para el cáncer de páncreas.
Idoxuridina		La idoxuridina es un antiviral análogo de la pirimidina que se usa para el tratamiento de infecciones oculares virales, incluida la queratitis por herpes simple.

Lamivudina		Lamivudina es un inhibidor de la transcriptasa inversa que se usa para tratar las infecciones por VIH y hepatitis B.
Maribavir		Maribavir es un inhibidor de la kinasa pUL97 del citomegalovirus (CMV) que se utiliza para el tratamiento de la infección por CMV refractaria después del trasplante.
Molnupiravir		El molnupiravir presenta actividad frente a ciertos virus ARN, incluyendo el SARS-CoV-2. Su estatus en el momento de redacción de este trabajo es de totalmente aprobado en UK y con permiso de comercialización de emergencia en USA, aunque no está definitivamente aprobado.
Nelarabina		La nelarabina es un análogo de nucleósido de purina y agente antineoplásico utilizado para el tratamiento de la leucemia linfoblástica de células T aguda y el linfoma linfoblástico de células T con respuesta clínica inadecuada a tratamientos quimioterapéuticos previos.
Penciclovir		El penciclovir es un inhibidor de la polimerasa nucleósido tópico que se utiliza en el tratamiento del herpes labial recurrente.
Remdesivir		Remdesivir es un análogo de nucleósido que se usa para tratar infecciones por virus de ARN, incluida la COVID-19.

Ribavirina		La ribavirina es un nucleósido de guanosina que se usa para tratar algunas formas de hepatitis C.
Sofosbuvir		Sofosbuvir es un agente antiviral de acción directa que se usa para tratar infecciones específicas por el virus de la hepatitis C (VHC) en combinación con otros agentes antivirales.
Telbivudina		La telbivudina es un análogo de nucleósido de timidina utilizado para el tratamiento de la hepatitis B crónica con evidencia clínica de replicación viral o elevaciones persistentes de las aminotransferasas séricas (ALT o AST).
Tenofovir alafenamida		Tenofovir alafenamida es un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de los nucleósidos que se utiliza para el tratamiento de la infección crónica por el virus de la hepatitis B en adultos con enfermedad hepática compensada.
Tenofovir disoproxil		Tenofovir disoproxil es un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido que se utiliza en el tratamiento de la infección por hepatitis B y en el tratamiento de la infección por VIH-1.
Ticagrelor		Ticagrelor es un inhibidor plaquetario P2Y12 que se utiliza en pacientes con antecedentes de infarto de miocardio o con síndrome coronario agudo (SCA) para prevenir futuros infartos de miocardio, accidentes cerebrovasculares y muerte cardiovascular.
Trifluridina (Trifluorotimidina)		La trifluridina es un inhibidor metabólico nucleosídico que se usa para tratar la queratoconjuntivitis y la queratitis epitelial causadas por el virus simple, y como parte de la quimioterapia para

		ciertos tipos de cánceres gastrointestinales metastásicos.
Valaciclovir		El valaciclovir es un antiviral de nucleósido de guanina que se usa para tratar las exacerbaciones del herpes.
Valganciclovir		Valganciclovir es un medicamento antiviral que se usa para tratar la retinitis por citomegalovirus (CMV) en pacientes diagnosticados con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).
Vidarabina		La vidarabina es un agente antiviral que se usa para tratar diversas infecciones virales.
Zalcitabina		La zalcitabina es un didesoxinucleósido que se usa para tratar el VIH.
Zidovudina (AZT)		La zidovudina es un didesoxinucleósido utilizado en el tratamiento de la infección por VIH.

El uso de análogos nucleosídicos en el sector farmacéutico como tratamiento para diferentes tipos de afecciones comenzó unos cuantos decenios atrás y ha contado con considerables éxitos, especialmente en el tratamiento contra el cáncer. Actualmente su uso mayoritario se centra en el tratamiento antiviral, especialmente contra el virus del HIV y ciertos tipos de herpes. Esto ha sido debido, por un lado, a que en oncología hay nuevas tendencias más específicas que están tomando el relevo, tales como anticuerpos monoclonales o terapia hormonal, entre otras, y por otro lado a éxitos notables acontecidos en los últimos años, como contra el SARS-CoV-2, como se ha comentado, o contra el VHC, infección para la cual hace unos años se aprobó el tratamiento con sofosbuvir de Gilead, consiguiendo la curación total de pacientes infectados ⁽⁴⁵⁻⁴⁹⁾.

Queda claro por lo tanto, según lo dicho, que los nucleósidos y sus análogos han atraído la atención de multitud de centros de investigación y de compañías farmacéuticas con finalidades distintas, principalmente como tratamientos anticancer y antivirales. La síntesis de este tipo de compuestos ha venido siendo química, y mayoritariamente sigue siéndolo. Sin embargo, los métodos químicos de obtención requieren de pasos de protección/desprotección de grupos funcionales que acarrearán bajos rendimientos y la necesidad del aislamiento de los intermedios de reacción, con la consiguiente generación de residuos, en algunos casos altamente tóxicos^(31, 44).

Para intentar superar estos inconvenientes, en la bibliografía se encuentran multitud de ejemplos en la que la obtención de análogos nucleosídicos se ha realizado por modificación enzimática^(44, 50-107). Estos métodos de obtención mediante la utilización de enzimas aportan a la química de los nucleósidos todas las ventajas mencionadas con anterioridad, ahorro de pasos de protección/desprotección, estereoquímica definida, condiciones suaves de reacción, baja generación de residuos tóxicos, etc...

Enzimas utilizados en síntesis de análogos nucleosídicos

Como se ha indicado anteriormente, la aproximación a la síntesis de análogos nucleosídicos mediante tecnología enzimática ha sido ampliamente explorada. Sin embargo, la tipología de los enzimas utilizados se limita a unos pocos grupos, lo cual condiciona las reacciones que se pueden llevar a cabo.

La mayoría de los ejemplos que se encuentran en bibliografía^(44, 50-107) se reducen al uso de enzimas pertenecientes a dos grupos:

- Nucleósido fosforilasas (NP).

Estos enzimas catalizan la fosforólisis reversible de un nucleósido de partida generando un intermedio fosforilado que puede ser transferido a una nueva base aceptora.

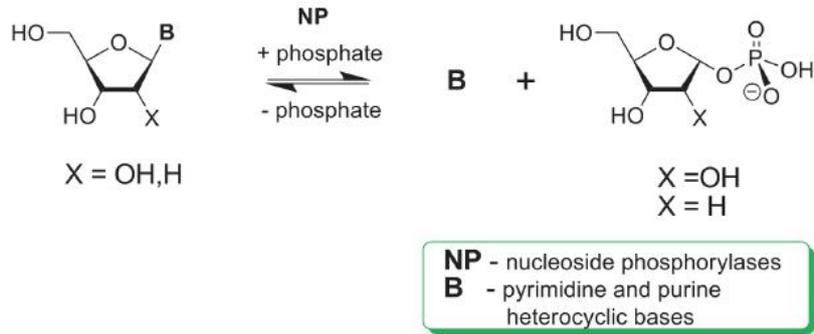


Imagen 2. Esquema general de la reacción de fosforólisis catalizada por enzimas del tipo NP ⁽⁹⁹⁾

El grupo de los enzimas NP está compuesto por diferentes representantes los cuales, siguiendo el mismo esquema general de reacción, se distinguen principalmente por el tipo de base nitrogenada que son capaces de reconocer. Según la base que reconocen, se pueden distinguir dos grupos principales de NP, las purina nucleósido fosforilasas (PNP) y las pirimidina nucleósido fosforilasas (PyNP). Atendiendo a esta distinción, una estrategia habitual para la síntesis de análogos nucleosídicos es combinar dos enzimas con diferente afinidad por sustrato de manera que uno libere el azúcar del nucleósido de partida y el segundo enzima lo transfiera a la base aceptora.

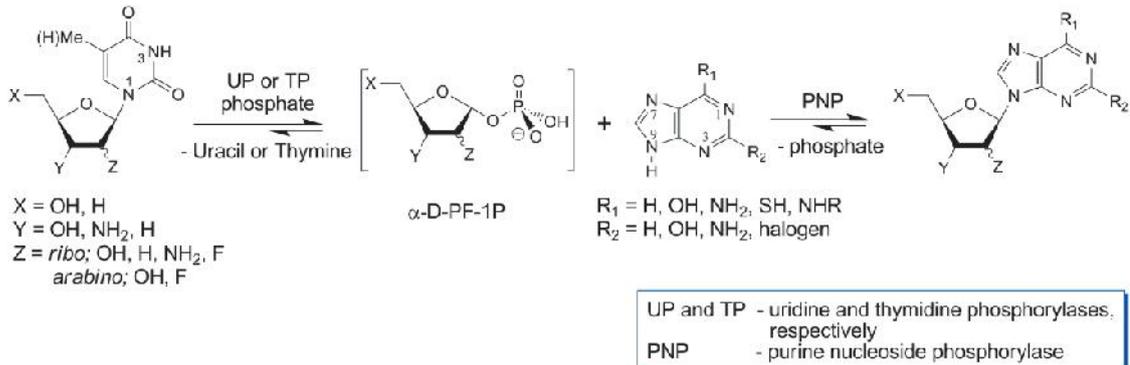


Imagen 3. Esquema general de síntesis de nucleósidos por transglicosilación mediada por combinación de enzimas tipo NP. Nótese que UP (uridina fosforilasa) y TP (timidina fosforilasa) son tipos de PyNP ⁽⁹⁹⁾

- N-Desoxirribosiltransferasas (NDT).

Estas enzimas son capaces de realizar la misma reacción global de transglicosilación que las NP, sin embargo lo hacen en un único paso sin necesidad de pasar el intermedio fosforilado. Si bien son capaces de reconocer a bases y nucleósidos tanto púricos como pirimidínicos, tienen afinidad por los nucleósidos derivados de la 2'-desoxirribosa. El esquema general de su reacción se indica en la siguiente figura.

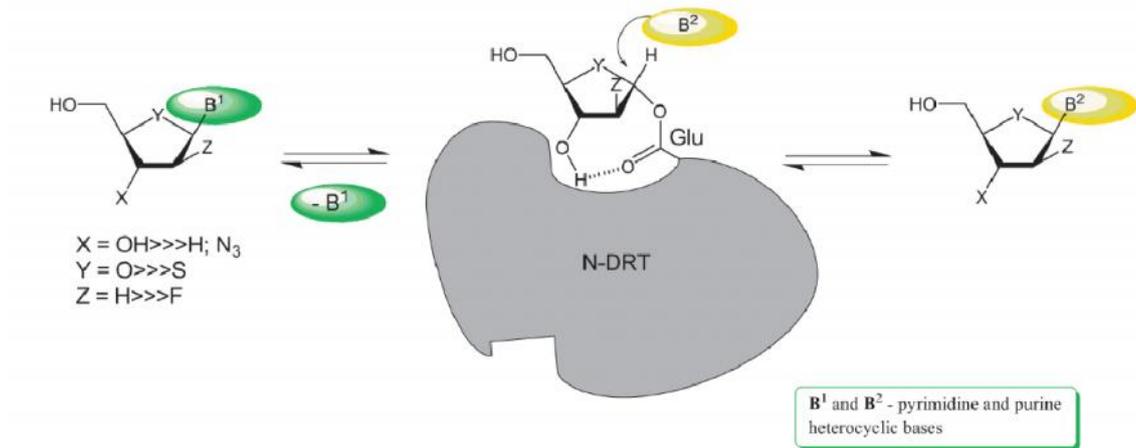


Imagen 4. Esquema general de la reacción de síntesis de nucleósidos por transglicosilación mediada por enzimas tipo NDT⁽⁹⁹⁾

Ambos grupos de enzimas, tanto NP como NDT, catalizan la transferencia del grupo azúcar de un nucleósido de partida a una base aceptora. Y si bien se han demostrado ser muy interesantes desde el punto de vista sintético, presentan algún inconveniente intrínseco a su propio mecanismo de reacción:

- Ambos grupos de enzimas establecen un equilibrio en la reacción, por lo que sus rendimientos nunca pueden llegar a ser cuantitativos. Esto es atribuible al hecho que sean enzimas del tipo de las transferasas (EC 2.).
- Uno de los sustratos de la reacción es ya un nucleósido en sí mismo, por lo que se acaba generando, como un subproducto de la reacción, una base saliente. Este hecho se plantea como un posible punto de mejora desde la química sostenible, ya que presenta una economía atómica muy baja.

Además de estos dos grupos de enzimas, se han propuesto algunas alternativas desde la academia para poder aumentar la diversidad de los productos obtenidos, especialmente en forma de cascadas enzimáticas *one-pot*^(97, 99). Tales propuestas incorporan el uso de enzimas del tipo riboquinasa (RK) o fosfopentomutasa (PPM), entre otros, que pueden aportar alternativas a la disponibilidad de sustratos de partida y que, pueden reducir la minimización de subproductos de la reacción. Sin embargo, estos enzimas no han llegado a establecerse en la literatura como enzimas de referencia en la síntesis de nucleósidos, como sí lo son las NP y las NDT, y también pertenecen a grupos que tienden a establecer equilibrios en la reacción (isomerasas y transferasas).

Enzimas desaminasas

Los enzimas del tipo desaminasa pertenecen al grupo de las hidrolasas (EC 3.). Este tipo de enzimas se caracteriza por romper un enlace de manera irreversible en presencia de agua. Este hecho favorece el avance de la reacción sin llegar a establecerse un auténtico equilibrio químico en el que dos especies se van interconvirtiendo la una en la otra a una velocidad constante.

De enzimas desaminasas hay multitud descritas, y algunos de ellas actúan naturalmente sobre nucleósidos, nucleótidos o bases nitrogenadas libres ⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾. Son capaces de realizar una reacción de eliminación de un grupo amino liberando amoníaco e incorporando al sustrato el oxígeno proveniente del agua.

Un esquema general de desaminación enzimática de un nucleósido se observa en la siguiente imagen.

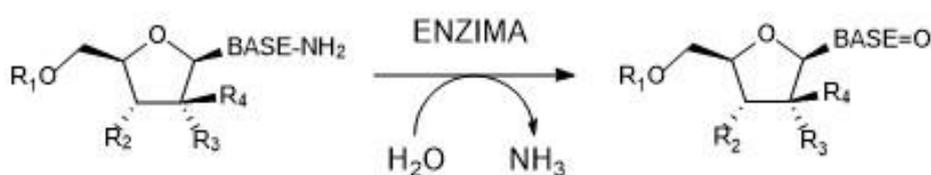


Imagen 5. Esquema general de una reacción de desaminación enzimática sobre un nucleósido².

El uso de estos enzimas para la síntesis de análogos nucleosídicos no está explotado comercialmente, y se les espera un mejor rendimiento y una menor formación de residuos en comparación con los enzimas NP y NDT. Este fue el punto de partida del trabajo experimental presentado en este documento.

Comentario sobre este trabajo

El presente trabajo está enmarcado en un entorno industrial. Toda la parte experimental se desarrolló en las instalaciones de IUCT (Institut Univ. De ciencia i tecnologia), empresa perteneciente al grupo Inkemia, y en colaboración con un *partner* industrial, de quien se omite el nombre por privacidad, con quien se estableció una colaboración más allá del concepto de cliente. Aunque por el momento no se ha escalado la producción del compuesto de interés,

² Fuente propia

este cliente proveyó en diferentes momentos intermedios, materias primas y patrones para apoyar en el desarrollo del proceso.. Este escenario ha condicionado el enfoque del proyecto. El compuesto para el que se ha desarrollado el presente trabajo es un compuesto conocido y aprobado por las agencias reguladoras, actualmente protegido por una familia de patentes. La primera de estas patentes protege el compuesto en sí mismo, pero esta será la primera de todas en expirar. En el momento en que esta patente caduque, el compuesto podrá entrar en la fase de comercialización libre, como un medicamento genérico. Sin embargo, durante un tiempo seguirá en vigor la patente de proceso que protege su síntesis.

Con estos antecedentes se planteó el proyecto desde el inicio. La estrategia ha sido obtener un proceso no infringente de patente (de proceso), suficientemente productivo, rentable y escalable. La reacción que se estudia en el presente trabajo se ubica en el último paso de la ruta de síntesis para la obtención del compuesto de interés y parte de un intermedio muy avanzado, algo muy habitual en las reacciones enzimáticas de los análogos de nucleósidos. Esto implica que el producto obtenido es ya el principio activo de interés, también conocido por API (active pharmaceutical ingredient) y debe tenerse en cuenta a la hora del estudio de las posibles impurezas generadas durante el proceso.

En IUCT se tenía un *know-how* previo en procesos enzimáticos y, en particular, en enzimas utilizados para la síntesis de NAs, principalmente con enzimas del tipo NPs y NDTs. La estructura que se pretendía obtener parecía complicada para ser abordada con estos grupos de enzimas, así que se decidió probar con enzimas tipo desaminasa, con los que no se había trabajado anteriormente en nuestro grupo de investigación. Aunque no se consiguió al primer intento, como se explica más adelante, es más, el enzima finalmente utilizado no se esperaba que tuviera capacidad de reconocer los sustratos de interés, lo que fue sorprendente y acabó generando la presentación de una solicitud de patente, actualmente concedida, se esperaba que este grupo de enzimas, por pertenecer al grupo de las hidrolasas, tuviera una alta procesividad y no se alcanzara un *plateau* en la reacción, lo cual debería repercutir en un aumento de la productividad y mayor facilidad en la recuperación de los productos. Este último punto se pudo demostrar experimentalmente.

Durante un momento de la ejecución del proyecto, y a la vista de que el enzima desarrollado presentó una excelente operatividad, se planteó el estudio de una reacción alternativa, enfocada también a la síntesis final del mismo API pero introduciendo el paso biocatalítico en un punto anterior de la ruta. No se profundizó en esta reacción alternativa aunque se demostró que también era posible en las condiciones ensayadas. Esta segunda reacción

probada se planteó para poder tener un proceso alternativo al principal y tenía el mismo objetivo que la reacción principal, conseguir una ruta sintética alternativa para poder llegar al mercado en condiciones competitivas.

En la presente tesis doctoral se recoge todo el trabajo realizado desde el inicio del proyecto, cuando se planteó la posibilidad de atacar esta molécula desde un punto de vista biocatalítico hasta que se definió un proceso de obtención del API de interés.

OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es el estudio de un proceso biotecnológico para la obtención de un análogo nucleosídico sofosbuvir mediante biocatálisis como alternativa al proceso químico existente y con la finalidad de poder ser comercializado como API en el momento en que expire la patente en vigor de producto estando vigente la patente de síntesis del mismo.

Para ello, se han definido y desglosado los siguientes objetivos específicos:

Objetivo preliminar

1. La identificación de los enzimas candidatos participantes en la biosíntesis

Desarrollo de las cepas ingenierizadas

2. La amplificación de los genes de interés correspondientes a la codificación de los enzimas previamente identificados
3. El clonaje de los genes amplificados
4. La construcción de las cepas recombinantes en las que se introducirán los fragmentos génicos
5. La expresión de las proteínas recombinantes

Producción del biocatalizador

6. La producción, a escala de laboratorio, de los enzimas de interés

Pruebas de concepto biocatalíticas

7. La definición del método analítico para el control de calidad del enzima
8. La ejecución de las reacciones cualitativas a nivel de PoC
9. La elección final del enzima interviniente

Caracterización del biocatalizador

10. La evaluación de las mejores condiciones de inducción del enzima
11. La determinación de la solubilidad del enzima
12. El estudio de la posible purificación del enzima
13. La evaluación de las diferentes presentaciones del catalizador
14. La definición del método de determinación de actividad enzimática
- 15.

Escalado de la producción enzimática

16. La adaptación del sistema de expresión (cepa/plásmido)
17. El estudio de la escalabilidad y reproducibilidad del proceso de fermentación
18. El estudio de la estabilidad del biocatalizador y fecha de caducidad del mismo

Optimización de la reacción biocatalítica

19. La determinación de los parámetros críticos de la reacción
20. La evaluación de los tampones de reacción y cambios de mejora
21. La determinación de la estequiometría enzima/sustrato
22. Los estudios de productividad del producto de interés
23. La evaluación de las impurezas de reacción
24. El estudio de la purificación y recuperación del producto de interés

Escalado de la reacción biocatalítica

25. El estudio del escalado de reacción y puesta a punto de las mejoras obtenidas a pequeña escala
26. La Optimización y reproducibilidad de la reacción biocatalítica a escala piloto

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Desarrollo de las cepas ingenierizadas

1.1. Análisis de ADN en geles de agarosa

Todos los productos de PCR obtenidos, así como las extracciones de plásmidos y digestiones se analizaron por electroforesis en geles submarinos de agarosa 1% pre-teñidos con SYBR Safe™ (Invitrogen, Waltham - USA) según se indica a continuación:

Tabla 5. Composición de los geles de agarosa para el análisis de ADN.

Componente	Cantidad
Agarosa	0,5 g
Tampón TAE	50 ml
SYBR Safe™ 10000X	5 µl

La composición del tampón TAE se indica en la siguiente tabla:

Tabla 6. Composición del tampón TAE utilizado en este trabajo

Componente	Cantidad (g ó ml/l)
Tris base	24,2 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	10 ml
Ácido acético glacial	5,7 ml
H2O purificada	csp. 1000 ml

Para la preparación de los geles se suspende la agarosa en el tampón TAE y se calienta a ebullición durante dos minutos en un microondas convencional a máxima potencia. Cuando ya no humea se añade el SYBR Safe™ y se vierte en el molde correspondiente con un peine para la formación de los pocillos. Una vez solidificado el gel, se sumerge en la cubeta llena con tampón TAE y se aplica un voltaje de 120 V durante 20 minutos en geles con doble peine y durante 40 minutos en geles con un único peine.

Acabada la electroforesis, el gel se visualiza en el sistema de captación de imágenes Gel Doc™ EZ System de BioRad.

1.2. Aislamiento de los genes de interés

La cepa *Escherichia coli* CECT 516 se hizo crecer durante 16 horas a 37°C en atmósfera aeróbica en una placa de medio McConkey (Scharlab, Sentmenat - Barcelona), cuya composición se indica en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición del medio McConkey, fórmula por litro.

Componente	Cantidad (g/l)
Digerido pancreático de gelatina	17,0
Peptona de carne	1,5
Peptona de caseína	1,5
Lactosa monohidrato	10,0
Sales biliares	1,5
Cloruro sódico	5,0
Rojo neutro	0,030
Cristal violeta	0,001
Agar	15,0

pH final a 25°C, 7,1 ±0,2

Una colonia crecida y aislada de la placa del medio de McConkey, se utilizó para hacer PCR colonial, sin purificación de ADN genómico, utilizando la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, Fitchburg - USA). El ciclo de PCR consignado se indica, para cada gen, en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones para las PCRs de aislamiento de los genes *cdd* y *dcd* de *E. coli*.

cdd		dcd	
Temperatura (°C)	Tiempo	Temperatura (°C)	Tiempo
94	10'	94	10'
94	1'	94	1'
52	45''	54	45''
72	1'	72	45''
72	10'	72	10'
4	∞	4	∞

X 35

X 35

Como cebadores para las PCRs indicadas en la Tabla 8 se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la Tabla 9. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados específicamente para el desarrollo experimental del trabajo expuesto en este documento y adquiridos a Biologio (Nijmegen - Países Bajos).

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *cdd* y *dcd* de *E. coli*.

Gen	Nombre cebador	Secuencia
cdd	EcoCDA_Forw	5'-CATATGCATCCACGTTTTCAAACC-3'
	EcoCDA_Rev	5'-GGATCCTTAAGCGAGAAGCACTCGG-3'
dcd	EcodCTPd_Forw	5'- CATATGCGTCTGTGTGACCGAG-3'
	EcodCTPd_Rev	5'- GGATCCTTAGTCTTTATCGATTCCGGC-3'

Para el análisis de rutina de los productos de PCR, así como para purificación de las bandas obtenidas de las digestiones en los casos requeridos, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (Fisher, Walthman - USA) pre-teñidos con SYBR Safe 10000X (Invitrogen, Walthman - USA). En cada gel de electroforesis se cargó, como mínimo, un marcador de tamaño para poder usarlo como referencia (NEB, Ipswich - USA).

1.3. Ligación en el vector intermedio *pGEM-T Easy*

Los productos de PCR se ligaron en el vector intermedio *pGEM-T Easy* (Promega, Fitchburg - USA), el cual permite un rastreo positivo de recombinantes por el método de observación de colonias blancas y azules en medios de cultivo sólidos suplementados con X-GAL. Este método de selección se fundamenta en el hecho que el lugar de inserción del fragmento recombinante está interrumpiendo la secuencia del gen *lacZ*, el cual codifica para una enzima capaz de hidrolizar el X-GAL (incoloro) en un compuesto insoluble de un color azul característico. Por lo tanto, aquellas colonias que crezcan de color blanco son compatibles con un un genotipo recombinante, mientras que las colonias que presenten una coloración azul han de ser consideradas como no recombinantes.

La ligación se llevó a cabo utilizando la ligasa de ADN de T4 (NEB, Ipswich - USA) y las reacciones de ligación se transformaron en viales de células competentes de *Escherichia coli* TOP10 preparadas según el método tradicional de permeabilización con CaCl_2 y transformación por choque térmico ⁽¹¹¹⁾. Las reacciones de transformación se plaquearon en medio LB suplementado con ampicilina, IPTG y X-GAL (todos los componentes de la marca Fisher y Scharlau) según receta indicada en la tabla Tabla 10.

Tabla 10. Composición del medio para el rastreo de transformantes

Componente	Cantidad/litro
LB base	25,0 g
Ampicilina sal sódica 100 mg/ml	1,0 ml
IPTG 0,1 M	1,0 ml
X-GAL 20 mg/ml	2,0 ml
Agar	15,0 g

Las colonias blancas que se tomaron para confirmación de los sospechosos de ser recombinantes se analizaron por PCR colonial como se ha descrito anteriormente, pero utilizando el programa y los cebadores indicados en la Tabla 11 y en la Tabla 12, respectivamente.

Tabla 11. Condiciones para las PCRs de comprobación de los recombinantes.

	Temperatura (°C)	Tiempo
	94	10'
X 40 {	94	1'
	48	45''
	72	1'10''
	72	10'
	4	∞

Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para las PCRs de comprobación de recombinantes en pGEM-T Easy

Nombre cebador	Secuencia
T7 promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'

Las colonias confirmadas como recombinantes se conservaron y se utilizaron para recuperar de su interior la construcción del plásmido intermedio (pGEM_cdd y pGEM_dcd) utilizando el kit "Plasmid mini" (ATP biotech, Taipei - Taiwan) y eluyendo con H₂O libre de DNAsas (Invitrogen, Waltham - USA) para evitar la inhibición de los pasos posteriores.

1.4. Construcción del vector de expresión y custodia de cepas

Una vez recuperados los plásmidos, fueron digeridos con la finalidad de recuperar los genes de interés, utilizando en ambos casos, los enzimas NdeI y BamHI (NEB, Ipswich - USA) según las condiciones indicadas en la Tabla 13. En paralelo, se digirió el plásmido pET22b(+), en las mismas condiciones, para poder prepararlo para ligación definitiva de los insertos recuperados de pGEM.

Tabla 13. Condiciones de digestión para la recuperación de los genes de interés de pGEM.

Componente	Volumen (μ l)
Plásmido	16 (<1 μ g DNA)
CutSmart® Buffer 10X	2
NdeI	1
BamHI	1
V _f : 20 μ l	
Incubación 2h a 37°C	

Una vez pasada la incubación, todo el volumen de las reacciones se cargó en geles de agarosa 1% para verificar las digestiones y para purificar desde ellos los fragmentos digeridos de interés en cada caso, siendo en la digestión de pET22 b(+) el esqueleto abierto del plásmido y en las digestiones de pGEM los insertos recuperados. Una vez recortadas las bandas de interés, estas se purificaron utilizando el kit “Gel/PCR DNA Fragment Extraction” (ATP biotech, Taipei - Taiwan) y eluyendo con H₂O libre de DNAsas (Invitrogen, Waltham - USA) para evitar la inhibición de la posterior ligación definitiva.

La construcción definitiva de los vectores de expresión recombinantes se llevó a cabo utilizando la ligasa de ADN de T4 (NEB, Ipswich - USA) según las condiciones indicadas en la Tabla 14.

Tabla 14. Condiciones de ligación de los genes de interés en pET22b(+)

Componente	Cantidad
Vector	15 fmol
Inserto (gen)	50 fmol
T4 ADN ligasa	1 μ l
Buffer (10X)	2 μ l
H ₂ O	csp. 20 μ l
V _f : 20 μ l	
Incubación 2h a RT	

Pasadas las incubaciones, las reacciones de ligación se transformaron en viales de células competentes de *Escherichia coli* TOP10 preparadas según el método tradicional de permeabilización con CaCl₂. Las reacciones de transformación se plaquearon en medio LB (Fisher, Waltham - USA) suplementado con ampicilina a 100 μ g/ml y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Varias colonias aisladas (hasta 14 por clonaje) se tomaron aleatoriamente de las placas de crecimiento y se analizaron por PCR colonial para confirmar la presencia del fragmento de interés utilizando el programa y los cebadores indicados en la Tabla 15 y en la Tabla 16, respectivamente.

Tabla 15. Condiciones para las PCRs de comprobación de los recombinantes de la construcción definitiva de los genes de interés en el vector pET22 b(+).

	Temperatura (°C)	Tiempo
	94	10'
X 40 {	94	1'
	50	45''
	72	1'10''
	72	10'
	4	∞

Tabla 16. Oligonucleótidos utilizados para las PCRs de comprobación de recombinantes en pET22 b(+).

Nombre cebador	Secuencia
T7 promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7 terminator	5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG -3'

Una vez identificadas las colonias positivas para cada clonaje, se envió el producto de amplificación a secuenciar al servicio de genómica de la *Universitat Autònoma de Barcelona* por secuenciación capilar Sanger. Los resultados de las reacciones secuenciación se compararon con las secuencias esperadas para confirmar la correcta construcción de los vectores recombinantes e identificar, en su caso, las mutaciones presentes respecto a las secuencias publicadas en las bases de datos. Estas comparaciones se realizaron utilizando el algoritmo de EMBOSS Needle disponible en el portal de EMBL (<https://www.ebi.ac.uk/>)

Las propias colonias que se usaron para las PCRs coloniales las cuales sirvieron para identificar los clones correctos, se sembraron en medio LB y fueron incubadas durante 20 horas a 37°C. Estos cultivos líquidos se usaron para preparar los stocks de las propias cepas de clonaje y para la recuperación de los plásmidos recombinantes. Para la preparación de los stocks, 8 ml de cada cultivo líquido fueron suplementados con 2 ml de glicerol estéril (Fagron Ibérica, Terrassa - Barcelona) y fueron congeladas para su conservación a -80°C.

Los plásmidos recuperados de las cepas de clonaje se utilizaron para transformar sendos viales de células competentes, preparadas por el método de CaCl₂, de la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3). Los células se transformaron por choque térmico y a continuación se plaquearon en

placas con medio LB suplementado con ampicilina a 100 µg/ml y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Una colonia aislada de cada clon se resembró en tubos de LB suplementado con ampicilina a 100 µg/ml y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Estos cultivos crecidos se suplementaron con glicerol estéril (20% v/v) y se utilizaron para preparar los stocks de las cepas de expresión. Estos stocks fueron conservados a -80°C.

2. Producción del biocatalizador

2.1. Cuantificación de proteína total

En todos los casos se cuantificó la proteína total mediante fluorómetro Qubit (Invitrogen, Waltham - USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la determinación de la cantidad de proteína de interés (proteína diana) se utilizó el valor de abundancia relativa de la proteína de interés respecto a la proteína total. Esta proporción se determinó con el sistema de captación de imágenes Gel Doc™ EZ System de BioRad.

2.2. Análisis de proteína en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Todas las inducciones de proteína, tanto a escala piloto como de producción, se analizaron en geles verticales SDS-PAGE bifásicos. Estos geles constaban de una fase apiladora superior (*stacking*) y una fase inferior separadora (*resolving*) según se indica a continuación:

Tabla 17. Composición de los geles SDS-PAGE para el análisis de proteínas.

Componente	Resolving	Stacking
Acrilamida/bisacrilamida 40 % (37,5:1)	3 ml	0,25 ml
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	---	0,63 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	2,5 ml	---
SDS 10 % (w/v)	0,1 ml	25 µl
Agua purificada	4,35 ml	1,59 ml
Persulfato amónico 10 % (w/v)	50 µl	12,5 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl

Todos los reactivos fueron comprados a Fisher.

Para la preparación de los geles se prepara la fase inferior y cuando ha polimerizado se prepara la fase superior con el peine para la formación de los pocillos. Una vez solidificado el gel, se sumerge en la cubeta llena con tampón de electroforesis SDS-PAGE (según la receta indicada a continuación) y se aplica un voltaje de 180 V durante 60 minutos.

Tabla 18. Composición del tampón de electroforesis SDS-PAGE utilizado en este trabajo.

Componente	Cantidad (g/l)
Tris base	3,03
Glicina	14,4
SDS	1
H2O purificada	csp. 1000 ml

Acabada la electroforesis, el gel se lava en agua dos veces en agua purificada y se tiñe con SimplyBlue™ SafeStain. Una vez teñido se decolora el exceso y se pueden visualizar las bandas directamente con luz visible. Para su documentación se utiliza el sistema de captación de imágenes Gel Doc™ EZ System de BioRad.

2.3. Producción en matraz

A escala de matraz, la producción del biocatalizador se realizó haciendo crecer las cepas de *Escherichia coli* BL21 recombinantes en medio TB, según receta indicada en la siguiente tabla:

Tabla 19. Receta estándar del medio TB utilizado para la fermentación de las proteínas recombinantes

Componente	Cantidad/litro
Extracto de levadura	24,0 g
Triptona	12,0 g
Glicerol	4,0 ml
K ₂ HPO ₄	12,54 g
KH ₂ PO ₄	2,31 g

Este medio, una vez autoclavado se suplementaba con ampicilina sal sódica (disuelta en agua y esterilizada por filtración) a una concentración final de 100 µg/ml. Adicionalmente, en el momento de la inducción ($Abs_{600} = 0,5 \pm 0,1$), se añadió IPTG (disuelto en DMSO sin esterilizar) a una concentración final de 1 mM. El tiempo de inducción de las fermentaciones en matraz varió desde dos horas en algunos casos como tiempo mínimo hasta las 18 horas en otros. La recogida del catalizador se efectuó por centrifugación del cultivo a 12000 RCF durante 10 minutos a 4°C, eliminación del sobrenadante, resuspensión del sedimento en NaCl 0,89%, sonicación del sedimento y nueva centrifugación como paso de limpieza del catalizador, de esta segunda centrifugación se recogió el sedimento identificándose como “clarificado”.

2.4. Producción en biorreactor

El escalado de la producción del enzima EcoCDA se realizó en un biorreactor BioFlo (New Brunswick, Eppendorf) a escala de 5 litros (4,5 litros de volumen de trabajo). Para la

fermentación se utilizó una estrategia de *fed-batch* adaptando una metódica previamente implementada en el grupo de trabajo. Según este método, se parte de un vial del banco celular inoculado en 10 ml de medio TB durante 30 minutos a 37 °C para la recuperación de las células. Pasada esta media hora, 5 ml se usan para inocular 30 ml de medio fresco TB precalentado suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y se mantienen en agitación durante 6 horas aproximadamente. La Abs_{600} de este inóculo debe ser de $3,0 \pm 0,5$. Una vez alcanzada la Ads_{600} deseada, 100 µl se utilizan para inocular asépticamente el reactor que contiene 2,5 litros de medio TB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se inicia la fase de crecimiento en el fermentador. El crecimiento durante la fase de *batch* se realiza en modo *DO-Stat*, consignando el porcentaje de oxígeno disuelto a 30 %. Esta fase dura alrededor de 12 horas y se identifica su fin en el momento en que aparece un pico en el oxígeno disuelto (*spike*), momento que suele coincidir con que el flujo de aire y de oxígeno puro descienden a sus valores mínimos (0,5 l/min y 0%, respectivamente), así como con un descenso en la velocidad de agitación. En el momento en que se completa la fase de crecimiento en *batch* se inicia el *fed-batch*. Para esta fase del cultivo se utiliza un medio de alimentación según la receta que se indica a continuación.

Tabla 20. Receta del medio de alimentación para la fermentación en lote-alimentado

Componente	Cantidad/litro
Extracto de levadura	120,0 g
Glicerol	500 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,0 g

La inducción del cultivo se inicia en el mismo momento que la alimentación del reactor, por lo que se añaden 2,5 ml de IPTG 1 M al vaso del reactor y 2 ml al reservorio con 2 l del medio de alimentación. Adicionalmente, al medio de alimentación también se añaden 2 ml de ampicilina 1000X (100 mg/ml) para alcanzar una concentración final de ésta de 100 µg/ml en el medio.

La alimentación se inicia de manera exponencial hasta que la bomba alcanza un 50 % de su velocidad máxima, momento en que esta velocidad de alimentación se mantiene lineal a dicha velocidad.

La fase de inducción se prolonga durante 4 h, tiempo en que se ha acabado también la alimentación del reactor.

Pasada la fase de fermentación, la recogida del cultivo se realiza como se esquematiza a continuación:

- Se enfría el cultivo a 4°C. Se mantiene a esta temperatura durante el resto del proceso para evitar la desestabilización del enzima.
- Se centrifuga todo el cultivo a 12.000 xg durante 20 minutos para recuperar toda la biomasa (sedimento). El sobrenadante se descarta.
- En este punto se puede parar el proceso congelando el sedimento recogido a -20 °C.
- Se resuspende el sedimento en tampón PBS frío (receta estándar) de manera tal que la Abs₆₀₀ de esta resuspensión se ajuste a 100.
- Todo el volumen del sedimento resuspendido en tampón PBS se lisa pasándolo en dos ciclos por el disruptor celular GEA Panda Niro Plus2000. El primer ciclo ajustando la presión a 1000 Bar y el segundo ciclo a 800 Bar. Con este paso se consigue una lisis celular superior al 99 %.
- Se centrifuga todo el lisado a 12000 xg durante 20 minutos para separar el *debris* celular. Se recupera el sobrenadante.
- Se filtra todo el sobrenadante por un sistema de filtración tangencial utilizando un filtro de membrana de celulosa con un tamaño nominal de poro de 0,45 µm. Se recupera la fracción permeada y se descarta la fracción retenida.
- Para mejorar su estabilidad (ver resultados), se incorporó un segundo paso de filtración tangencial esterilizante por un tamaño de poro de 0,22 µm.
- Esta fracción clarificada se congela a -80 °C sin necesidad de realizar aislamiento de la proteína de interés por cromatografía ni ningún paso adicional de purificación, precipitación o concentración.
- Eventualmente se puede liofilizar tras su congelación.

3. Caracterización del biocatalizador

3.1. Optimización del método de determinación de actividad

Inicialmente se intentó poner a punto como método estándar de determinación de actividad tipo para el enzima EcoCDA un método colorimétrico. Dicho método no llegó a validarse

debido a su variabilidad y a la dificultad en detectar pequeñas variaciones en la actividad, ya que se requería trabajar en condiciones muy diluidas para no saturar el detector. Sin embargo, tal método sirvió para poner a punto las condiciones de partida del método de cuantificación por HPLC. Aunque la transferencia directa del método colorimétrico al método cromatográfico presentaba como principal limitación la baja concentración de sustrato o producto, que podía dificultar la cuantificación a niveles bajos de actividad.

En el laboratorio se disponía de un método general habitualmente usado en la determinación de nucleósidos, que emplea un gradiente de agua/metanol con un tiempo total de adquisición de 30 minutos. Sin embargo, los dos analitos de interés, dC y dU, eluían antes de los 15 minutos de análisis, indicativo que se podía acortar tiempo de análisis.

Por ambos motivos, se decidió optimizar el método HPLC con el objetivo de mantener la separación de los dos analitos reduciendo el tiempo de análisis y averiguar el rango de concentraciones en que el producto final, dU, presentaba una respuesta lineal.

Después de diferentes pruebas en modo isocrático con diferente composición de FM como tampón fosfato, ACN, agua y MeOH, se obtuvo que las condiciones óptimas de separación de dC y dU por HPLC fueran las siguientes:

- FM: 95/5 agua/metanol
- Flujo: 1 ml/min
- Columna: C18 25x0,46 cm y tamaño de partícula 5 μ m
- Temperatura columna: 40 $^{\circ}$ C
- Detección: 254 nm
- Volumen de inyección: 10 μ l
- Tiempo de análisis: 15 minutos

3.2. Definición del método de detención de la reacción de actividad

En los métodos generales de determinación de la actividad enzimática utilizados anteriormente en el laboratorio para otros enzimas, la reacción se detenía añadiendo 1 ml de metanol, obteniendo una mezcla del 50% en disolvente orgánico. A este porcentaje de metanol, la enzima (0,1 μ g/ml en la reacción) se demostró que se detenía y no transformaba más sustrato a producto final.

Sin embargo, para la optimización de la determinación de la actividad enzimática, se pretendía aumentar la concentración de sustrato y de enzima en el medio de reacción pero manteniendo la relación estequiométrica entre ellos. Este aumento podía hacer que la adición de un volumen de metanol igual al volumen de reacción fuera insuficiente para detener la actividad de la enzima. Por ello, se decidió realizar unos experimentos previos para determinar el porcentaje necesario de metanol para detener la reacción.

Así, en cuatro tubos de ensayo se añadieron 900 μ l de solución 10 mM de dC en tampón fosfato 100 mM a pH 7, y las cantidades crecientes de metanol para obtener los porcentajes finales de 50, 60, 70 y 80% de metanol en el medio. A continuación, se añadieron 100 μ l de una solución de enzima de 50 μ g proteína total/ml y se tomó una alícuota de cada tubo (cada una se diluyó con agua para obtener una concentración de dC de 1 mM para estar dentro del intervalo de linealidad y también disminuir el porcentaje de metanol de la mezcla) que se filtró a través de 10 kDa antes de su análisis por HPLC. Después de 4 horas se tomó otra alícuota de cada tubo y se realizó la misma dilución y filtración que su homólogo de tiempo cero.

4. Diseño y optimización de la reacción biocatalítica

4.1. Reproducibilidad de los resultados de la PoC

La fase de optimización se inició estudiando la reproducibilidad de los resultados observados en la PoC, puesto que todo el presente trabajo de optimización se realizó con un lote distinto tanto de biocatalizador como de sustrato 3.2 respecto a los utilizados en la fase PoC. Tal como se ha comentado anteriormente, este nuevo lote permitió que todo el trabajo a realizar posteriormente fuera homogéneo por lo que respecta al biocatalizador, para que éste no fuera una variable adicional en la optimización.

La reacción objetivo a optimizar se muestra a continuación:

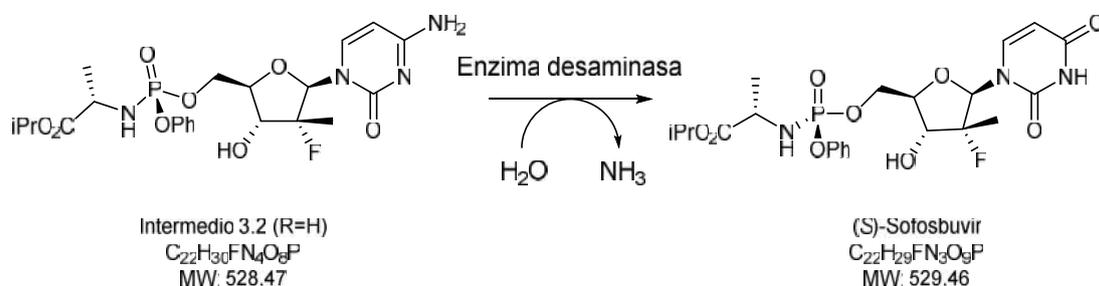


Imagen 6. Esquema general de la reacción de interés

Las condiciones de reacción para el ensayo se muestran a continuación:

Volumen de reacción: 4 ml

Concentración inicial de nucleósido sustrato (intermedio 3.2): 7,5 mM (3,96 g/l)

Tampón fosfato: 30 mM a pH 7

Volumen de enzima: 40 μ l

Estequiometría enzima/sustrato (1 equivalente): 2,0 UA/ μ mol (3,78 UA/mg)

Temperatura de incubación: 37°C

Tiempo de incubación: 24 horas (agitación magnética 250 rpm)

La monitorización de las reacciones se llevó a cabo durante 29 h, mediante la toma de controles intermedios de reacción. Las alícuotas tomadas se filtraron inmediatamente por un filtro de 10 kDa en formato microplaca por centrifugación a 4500 rpm a 25°C durante 1 hora 15 minutos³. Los crudos de reacción se analizaron por HPLC según el método descrito más adelante.

Se llevaron a cabo dos pruebas de concepto paralelamente, en las condiciones descritas, con ambos lotes de sustrato disponibles (RT-245-071 y MMG-263-048-02).

4.2. Reactivos y patrones utilizados

A continuación se detallan los reactivos utilizados en los experimentos descritos en la fase de optimización de la reacción biocatalítica:

³ El tratamiento de la alícuota de control de proceso se realizó con el objetivo de eliminar restos biológicos que pudieran dañar el sistema cromatográfico, pero no es necesario en el proceso de tratamiento del crudo de reacción total (*work-up*)

Tabla 21. Descripción de nucleósidos sustratos y patrones utilizados en esta fase del estudio

Compuesto	Función	Proveedor	Referencia	Lote	PM	Pureza (%)
Intermedio 3.2	NA sustrato	Cliente ⁴	SOF-PC2	RT-245-071	528,47	99,21
Intermedio 3.2	NA sustrato	Cliente	SOF-PC2	MMG-263-049-02	528,47	98,75
Intermedio 3.2	NA sustrato	Cliente	SOF-PC2	MMG-263-049-03	528,47	95,61
Intermedio 3.2	NA sustrato	Cliente	SOF-PC2	RT-263-032-02	528,47	92,62
Impureza I ⁵	Impureza	Cliente	N.D.*	Se-176-03	529,45	96,30
Sofosbuvir ⁶	Producto final	Cliente	N.D.	MG-238-19-01	529,45	99,40

* N.D.: No Disponible

Tabla 22. Estructuras de los sustratos y productos de interés.

Compuesto	Estructura
Intermedio 3.2	
(R)-sofosbuvir (impureza I)	
Sofosbuvir	

⁴ Por confidencialidad se omite el nombre de la empresa cliente

⁵ Diastereoisómero en el P => (R)-sofosbuvir

⁶ (S)-sofosbuvir

4.3. Método de análisis cromatográfico por HPLC

Método facilitado por el cliente, adaptado:

-) Equipos utilizados:
 - o HPLC Agilent 1200 con Detector DAD (HPLC-04)
 - o HPLC Agilent 1260 Infinity con detector UV-Vis (HPLC-01)
-) Fase móvil: 95/5 H₃PO₄ 0,1% sol. Acuosa / ACN
-) Flujo: 1 mL/min
-) Volumen de inyección: 10 µL
-) Longitud de onda: 260 nm
-) Temperatura de columna: 30°C

Descripción de la columna:

-) Marca: Teknokroma
-) Modelo: Tracer Excel 120 ODSA (C18)
-) Diámetro x longitud: 0,46 x 25 cm
-) Tamaño de partícula: 5 µm
-) Uso de precolumna Tracer Excel ODS 10 x 3,2 mm

Gradiente de fase móvil:

Tabla 23. Gradiente de fase móvil en el método de HPLC⁷

Tiempo (min)	Composición de la fase móvil (%)	
	H ₃ PO ₄ 0,1% sol. acuosa	ACN
0	95	5
5	95	5
10	80	20
30	20	80
40	20	80
Equilibrado	50	5
	60	5

⁷ Facilitado por el cliente y adaptado

En la Tabla 24 se describen los tiempos de retención para los compuestos de interés. La columna utilizada en IUCT es equivalente a la descrita y usada por el cliente, proporcionando una retención similar a la descrita por el cliente, aunque ligeramente superior debido al uso de precolumna por parte de IUCT.

Tabla 24. Datos de tiempos de retención para sustrato, impureza y producto final con el método analítico facilitado por el cliente

Compuesto	Datos facilitados por el cliente		Datos obtenidos por IUCT	
	Tiempo de retención (min)	RRT (vs sofosbuvir)	Tiempo de retención (min)	RRT (vs sofosbuvir)
Intermedio 3.2 R=H	16,85	0,79	19,11	0,84
Impureza I	21,06	0,98	22,38	0,98
Sofosbuvir	21,37	1,00	22,69	1,00

En estas condiciones analíticas se realiza una curva de calibración para el intermedio 3.2 y para el producto final sofosbuvir (inyectando por triplicado cada patrón disuelto en una mezcla H₂O/MeOH 1/1) con el objetivo de establecer la concentración adecuada para diluir las muestras a analizar durante el proceso de optimización. El intermedio 3.2 presenta una respuesta lineal en el rango de concentraciones de 127 ppm a 738 ppm (ver Imagen 7), y para el sofosbuvir entre 124 ppm y 687 ppm (ver Imagen 8 y Imagen 9), independientemente del equipo HPLC utilizado.

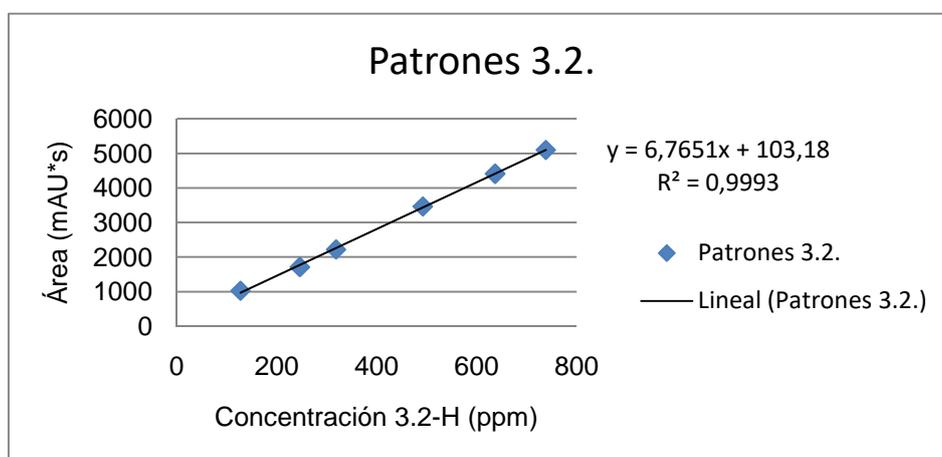


Imagen 7. Curva de calibrado para el intermedio 3.2 según el método analítico por HPLC a 260 nm (en HPLC-04)

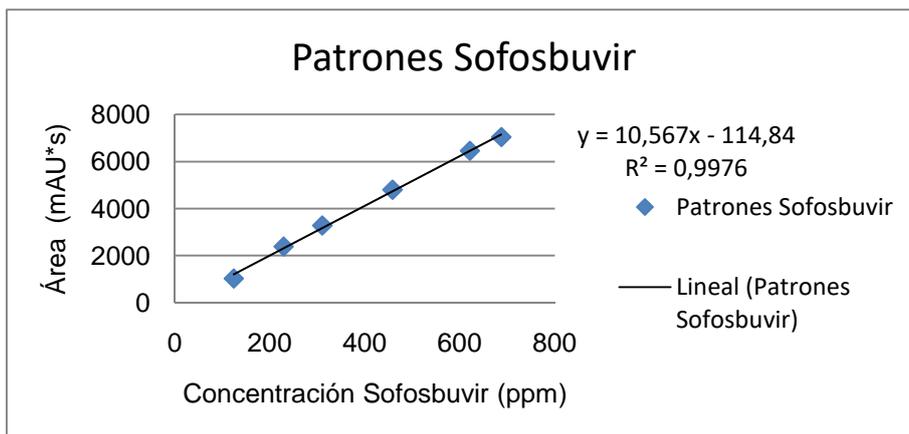


Imagen 8. Curva de calibrado para sofosbuvir según el método analítico por HPLC a 260 nm (en HPLC-04)

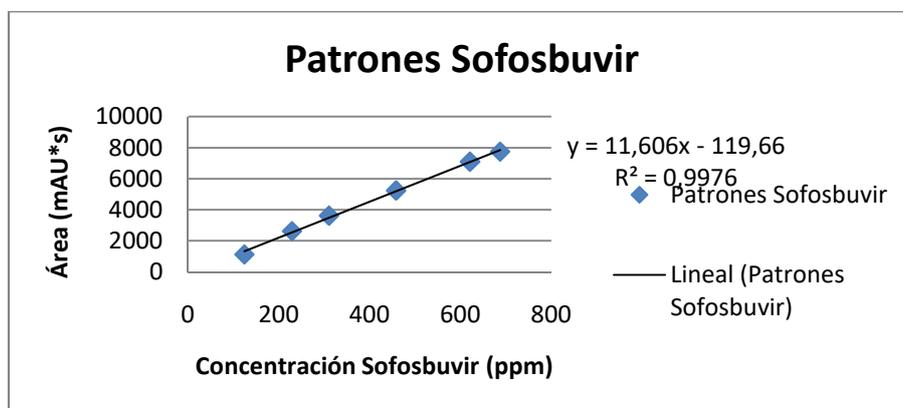


Imagen 9. Curva de calibrado para sofosbuvir según el método analítico por HPLC a 260 nm (en HPLC-01)

4.4. Cuantificación de las muestras analizadas

4.4.1. Conversión como base de cálculo

El resultado de conversión de reacción mostrado en los resultados se obtiene a partir de las áreas del pico cromatográfico del producto final (sofosbuvir) y el pico del producto de partida (intermedio 3.2). Para ello se tiene en cuenta el factor respuesta de cada compuesto ($FR = \text{Área} / \text{concentración}$) mediante la inyección por triplicado de patrón de sofosbuvir, de concentración perfectamente conocida (415 ppm).

Así, el factor respuesta de sofosbuvir es 1,5 veces mayor al factor respuesta del intermedio 3.2 ($FR_{(\text{int. 3.2})} = 0,65 * FR_{(\text{Sof.})}$ ó $FR_{(\text{Sof.})} = 1,5 * FR_{(\text{int. 3.2})}$).

El cálculo de conversión se realiza según la fórmula siguiente:

$$\text{Conversión}(\%) \times \frac{\text{Área}(\text{Sofosbuvir}) * 0,65}{(\text{Área}(\text{Sofosbuvir}) * 0,65) \Gamma \text{Área}(\text{Int.3.2})} * 100$$

4.4.2. Porcentaje estimado de sofosbuvir formado como base de cálculo

Paralelamente, se ha calculado el porcentaje estimado de sofosbuvir formado en relación al valor teórico esperado. Se evita denominarlo “rendimiento” para no confundir este parámetro con el producto ya aislado y purificado.

Para ello se inyecta mínimo por triplicado un patrón de concentración perfectamente conocida de sofosbuvir (415 ppm).

El porcentaje estimado de sofosbuvir se obtiene calculando la concentración de sofosbuvir en la muestra frente la concentración teórica a obtener a partir de la concentración inicial de sustrato 3.2. Así, se calcula la concentración de sofosbuvir en la muestra a partir del área del pico de sofosbuvir en la muestra (cuya área está dentro del intervalo de linealidad) y con el valor medio de área del patrón inyectado en la misma secuencia, teniendo en cuenta la concentración inicial de sustrato y las diluciones realizadas a la muestra para su análisis. Así, el porcentaje estimado de sofosbuvir se realiza según la fórmula siguiente:

$$\text{Sofosbuvir_estimado}(\%) = \frac{(\text{Área}(\text{Sof.})_{\text{muestra}} * [\text{Sof.}]_{\text{patrón}}(\text{ppm})) / \text{Área}(\text{Sof.})_{\text{patrón}}}{[\text{sustrato}3.2]_{\text{inicial}}(\text{mM}) * \text{PM}(\text{Sof.})} * \text{dil. muestra} * 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo se presentan de manera ordenada en base a la definición de los objetivos planteados. Esta estructura describe la cronología conceptual del desarrollo del proyecto, aunque experimentalmente algunas de las etapas se solaparon en el tiempo.

1. Identificación de enzimas candidatas

Desde el inicio del proyecto se planteó que la reacción biocatalítica objetivo para conseguir la síntesis del sofosbuvir se llevara a cabo en el último paso de síntesis. De esta manera, los intermedios previos en la ruta completa se alejaban más de la ruta de síntesis protegida. Así pues, dado que la idea era utilizar enzimas tipo hidrolasa, específicamente enzimas tipo desaminasa, el paso propuesto fue el que se indica a continuación.

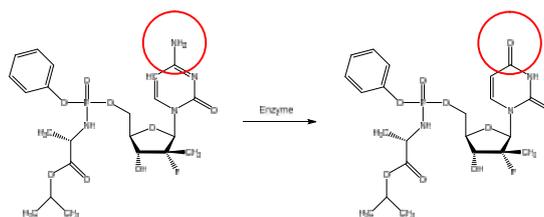


Imagen 10. Reacción objetivo del presente trabajo. Señalando la posición a desaminar enzimáticamente

Con esta reacción en mente se realizó una búsqueda de enzimas candidatas utilizando las bases de datos Brenda (<https://www.brenda-enzymes.org>), UniProt (<https://www.uniprot.org>) y la web de referencia de la Enzyme Commission (<https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>). En esta búsqueda se identificaron tres posibles candidatos:

- dCTP desaminasa (desoxicitidina trifosfato desaminasa, EC 3.5.4.13). Cuya reacción natural es la indicada.

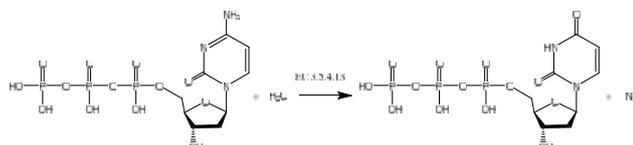


Imagen 11. Reacción natural del enzima dCTP desaminasa

- dCMP desaminasa (desoxicitidina monofosfato desaminasa, EC 3.5.4.12). Cuya reacción natural es la indicada.

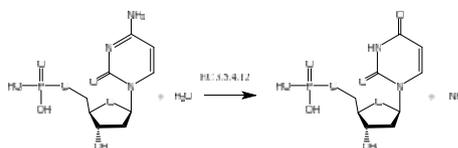


Imagen 12. Reacción natural del enzima dCTP desaminasa

- CDA (citidina desaminasa, EC 3.5.4.5). Cuya reacción natural es la indicada.

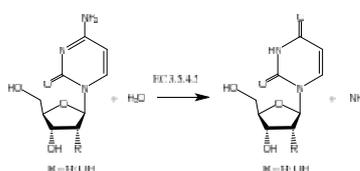


Imagen 13. Reacción natural del enzima CDA

Estos enzimas están descritos en diferentes organismos, tanto procariotas como eucariotas. En los tres casos se encuentran descritos en *Escherichia coli*, organismo que se escogió como donador ya que el *know-how* previo desarrollado en el grupo indicaba que la producción recombinante es más factible si el donador y el hospedador son cercanos (en este caso el hospedador iba a ser también *Escherichia coli*) que si se trabaja con un donador alejado evolutivamente del hospedador.

La elección de estos tres enzimas candidatos se hizo pensando en dos criterios principalmente:

- A) El compuesto objetivo sofosbuvir, así como su precursor, es portador en posición 5' del azúcar de un sustituyente organofosforado muy voluminoso. Este hecho llevó a especular que un enzima cuyo sustrato natural posea un sustituyente igualmente voluminoso en esta posición podría facilitar el reconocimiento del compuesto de interés por parte del enzima. Este criterio llevó a la elección de los enzimas dCTP desaminasa y dCMP desaminasa.
- B) Por otro lado, en la posición 2' del azúcar, del compuesto de interés se encuentran dos sustituyentes que no podían ser menospreciados a pesar de no ser muy voluminosos, especialmente teniendo en cuenta que uno de ellos es un halógeno. Según se ha indicado más arriba, los enzimas dCTP desaminasa y dCMP desaminasa reconocen desoxirribonucleótidos, lo que llevó a pensar que un enzima capaz de reconocer tanto ribo- como desoxirribonucleótidos podría ser más capaz de reconocer las estructuras de interés. Este criterio llevó a la elección preliminar del enzima CDA.

Como se discute más adelante, de estos tres enzimas únicamente dos de ellos se llegaron a desarrollar, en concreto los enzimas dCTP desaminasa y CDA de *Escherichia coli* (identificados como Eco dCTPd y EcoCDA). Esto se debió a que inicialmente se probó el enzima Eco dCTPd por priorizar el criterio de elección "A", dado que los resultados fueron contundentemente negativos se probó con EcoCDA y este enzima funcionó tan bien que nunca se llegó a desarrollar ni a probar el enzima dCMP desaminasa.

2. Desarrollo de las cepas ingenierizadas

2.1. Aislamiento de los genes de interés

2.1.1. Amplificación del gen *dcd* de *Escherichia coli*

El producto obtenido de PCR se analizó en un gel de agarosa, cargando en el mismo gel un marcador de peso molecular. El tamaño esperado para el gen *dcd* es de 582 pb.

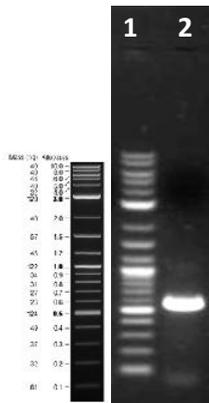


Imagen 14. Análisis electroforético del producto de PCR para el aislamiento del gen *dcd* de *E. coli*. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carril 1: marcador; Carril 2: producto de PCR.

Se aprecia una banda clara y pura a la altura esperada, confirmando que la reacción de PCR consiguió amplificar un fragmento compatible con la secuencia de *dcd*. Aunque se aprecia una banda tenue en la parte baja del gel atribuible a ser *primer dimer*, no es preocupante y no se aprecian auténticas inespecificidades, por lo que se decidió continuar sin realizar ninguna purificación adicional. El tubo de reacción se conservó congelado.

2.1.2. Amplificación del gen *cdd* de *Escherichia coli*

El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa, cargando en el mismo gel un marcador de peso molecular. El tamaño esperado para el gen *cdd* es de 885 pb.

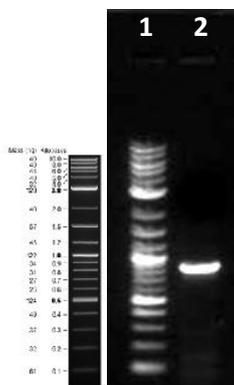


Imagen 15. Análisis electroforético del producto de PCR para el aislamiento del gen *cdd* de *E. coli*. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carril 1: marcador; Carril 2: producto de PCR.

Se aprecia una banda clara y pura a la altura esperada, confirmando que la reacción de PCR consiguió amplificar un fragmento compatible con la secuencia de *cdd* sin ninguna inespecificidad. El tubo de reacción se conservó congelado.

2.2. Clonajes de los genes amplificados

2.2.1. Clonaje del gen *dcd* de *Escherichia coli* en *pGEM-T Easy*

El producto de amplificación del gen *dcd* se ligó sin purificación previa al vector *pGEM-T Easy* y la reacción de ligación se transformó en células de *E. coli* TOP10 competentes. Tras la siembra en placa

y posterior incubación, crecieron cientos de colonias, tanto blancas como azules. 12 colonias blancas se aislaron (colonias dcd_1 a dcd_12) y se analizaron por digestión. El resultado de las digestiones se muestra en la Imagen 16.

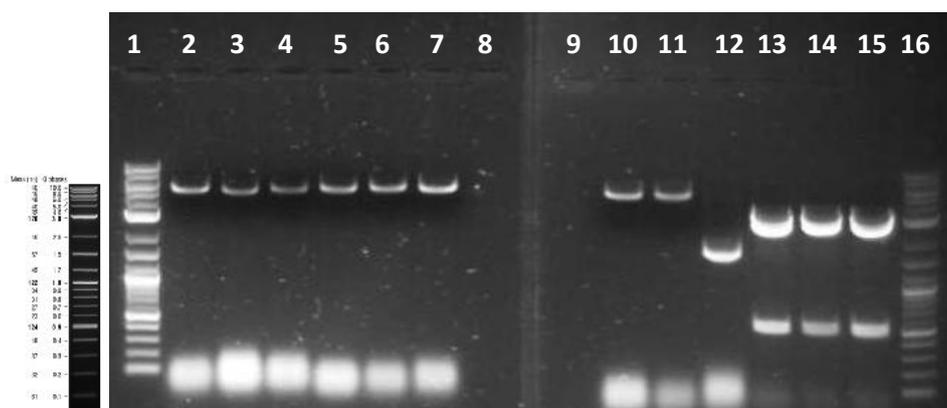


Imagen 16. Análisis electroforético de la digestión de los plásmidos extraídos de las colonias dcd_1 a dcd_12. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: geles. Carriles 1 y 16: marcador; Carril 2: digestión *miniprep* dcd_1; Carril 3: digestión *miniprep* dcd_2; Carril 4: digestión *miniprep* dcd_3; Carril 5: digestión *miniprep* dcd_4; Carril 6: digestión *miniprep* dcd_5; Carril 7: digestión *miniprep* dcd_6; Carriles 8 y 9: vacíos; Carril 10: digestión *miniprep* dcd_7; Carril 11: digestión *miniprep* dcd_8; Carril 12: digestión *miniprep* dcd_9; Carril 13: digestión *miniprep* dcd_10; Carril 14: digestión *miniprep* dcd_11; Carril 15: digestión *miniprep* dcd_12.

El resultado del análisis de esta digestión confirmó que 9 de las 12 colonias presentaban algún problema con la construcción. Sin embargo, tres colonias (dcd_10, dcd_11 y dcd_12) sí presentaban la correcta inserción del gen dcd de *E. coli* dentro del vector pGEM, apreciándose una banda de ≈ 3 kpb atribuible al esqueleto vacío del vector y una de < 600 pb atribuible al gen dcd. La banda borrosa en la parte baja del gel (≈ 100 pb) se corresponde con restos de ARNs degradados durante la purificación del ADN plasmídico.

De este mismo gel se aprovechó para recortar la banda de interés de los tres carriles en que se habían cargado las muestras y se conservaron juntas para su posterior copurificación.

2.2.2. Clonaje del gen *cdd* de *Escherichia coli* en *pGEM-T Easy*

El producto de amplificación del gen *cdd* se ligó sin purificación previa al vector pGEM-T Easy y la reacción de ligación se transformó en células de *E. coli* TOP10 competentes. Tras la siembra en placa y la incubación, únicamente crecieron 6 colonias, siendo 5 de ellas azules y una única blanca (colonia *cdd_1*). Esta colonia blanca se conservó y se utilizó para realizar una *miniprep* y digestión. El resultado de la digestión se muestra en la Imagen 17.

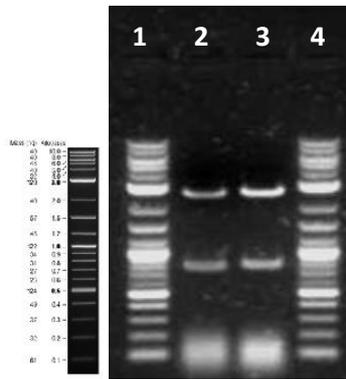


Imagen 17. Análisis electroforético de la digestión del plásmido extraído de la colonia *cdd_1*. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carriles 1 y 4: marcador; Carriles 2 y 3: producto de la doble digestión del plásmido con NdeI y BamHI.

El resultado del análisis de esta digestión confirmó la correcta inserción del gen *cdd* de *E. coli* dentro del vector pGEM, apreciándose una banda de ≈ 3 kpb atribuible al esqueleto vacío del vector y una de < 900 pb atribuible al gen *cdd*. La banda borrosa en la parte baja del gel (≈ 100 pb) se corresponde con restos de ARNs degradados durante la purificación del ADN plasmídico.

De este mismo gel se aprovechó para recortar la banda de interés de los dos carriles en que se había cargado la muestra y se conservó para su posterior purificación.

2.2.3. Clonaje del gen *dcd* de *Escherichia coli* en pET22 b(+)

Las bandas recortadas del gel correspondientes a las tres colonias positivas se copurificaron y se utilizaron para clonar dentro del vector de expresión pET22 b(+) linealizado. Una vez realizada la ligación y la transformación en *E. coli* TOP10, en las placas sembradas con la reacción de transformación se apreciaron cientos de colonias. 70 de estas colonias se aislaron en placas maestras. Con 28 de ellas (*dcd_22_1* a *dcd_22_28*) se realizaron PCRs coloniales para confirmar la presencia del inserto de interés. El resultado del análisis electroforético de estas PCRs coloniales se muestra en la Imagen 18. El tamaño esperado para el producto de PCR de un recombinante positivo es de unos 800 a 900 pb y para un resultado no recombinante es de unos 200 a 300 pb.

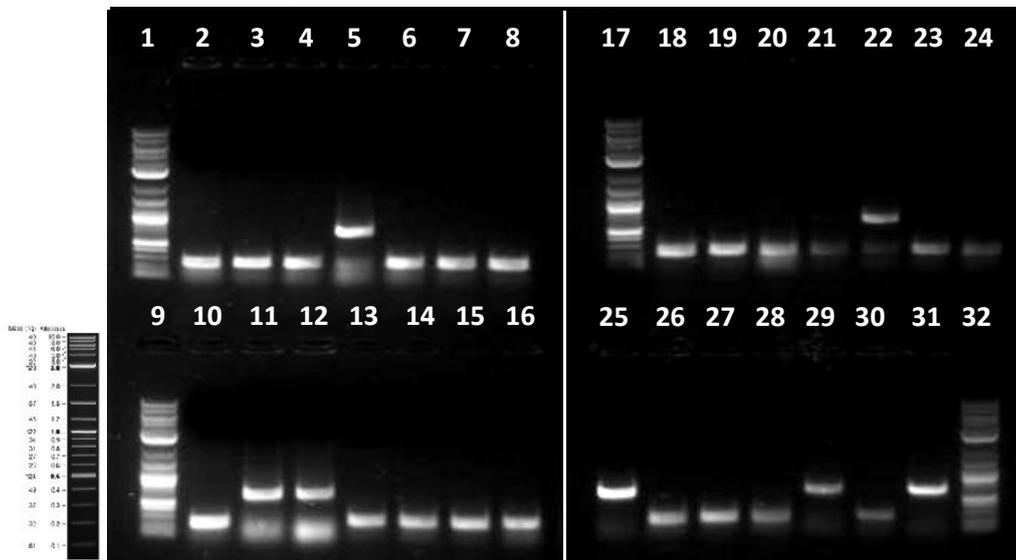


Imagen 18. Análisis electroforético del producto de PCR para la confirmación de la inserción del gen *dcd* de *E. coli* en pET22 b(+). Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: geles. Carriles 1, 9, 17 y 32: marcador; Carril 2: PCR sobre *dcd_22_1*; Carril 3: PCR sobre *dcd_22_2*; Carril 4: PCR sobre *dcd_22_3*; Carril 5: PCR sobre *dcd_22_4*; Carril 6: PCR sobre *dcd_22_5*; Carril 7: PCR sobre *dcd_22_6*; Carril 8: PCR sobre *dcd_22_7*; Carril 10: PCR sobre *dcd_22_8*; Carril 11: PCR sobre *dcd_22_9*; Carril 12: PCR sobre *dcd_22_10*; Carril 13: PCR sobre *dcd_22_11*; Carril 14: PCR sobre *dcd_22_12*; Carril 15: PCR sobre *dcd_22_13*; Carril 16: PCR sobre *dcd_22_14*; Carril 18: PCR sobre *dcd_22_15*; Carril 19: PCR sobre *dcd_22_16*; Carril 20: PCR sobre *dcd_22_17*; Carril 21: PCR sobre *dcd_22_18*; Carril 22: PCR sobre *dcd_22_19*; Carril 23: PCR sobre *dcd_22_20*; Carril 24: PCR sobre *dcd_22_21*; Carril 25: PCR sobre *dcd_22_22*; Carril 26: PCR sobre *dcd_22_23*; Carril 27: PCR sobre *dcd_22_24*; Carril 28: PCR sobre *dcd_22_25*; Carril 29: PCR sobre *dcd_22_26*; Carril 30: PCR sobre *dcd_22_27*; Carril 31: PCR sobre *dcd_22_28*.

Se aprecia en el gel que las PCRs coloniales funcionaron bien en todos los casos y que ninguna colonia quedó sin resultado. Aunque en algunos carriles parecían apreciarse algunas señales dobles.

De las colonias *dcd_22_4*, *dcd_22_9*, *dcd_22_10*, *dcd_22_19*, *dcd_22_22*, *dcd_22_26* y *dcd_22_28* se prepararon inóculos y *minipreps* para continuar con las confirmaciones. De las 7 *minipreps* se volvieron a realizar PCRs, cuyos resultados se muestran en la Imagen 19.

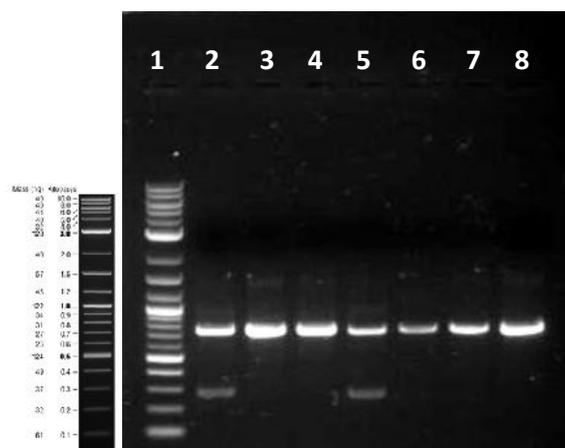


Imagen 19. Análisis electroforético de las PCRs sobre las *minipreps* de las colonias que habían aparecido como positivas en el primer rastreo. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carril 1: marcador; Carril 2: PCR *miniprep dcd_22_4*; Carril 3: PCR *miniprep dcd_22_9*; Carril 4: PCR *miniprep dcd_22_10*; Carril 5: PCR *miniprep dcd_22_19*; Carril 6: PCR *miniprep dcd_22_22*; Carril 7: PCR *miniprep dcd_22_26*; Carril 8: PCR *miniprep dcd_22_28*.

Las PCRs funcionaron bien y se confirmó que las colonias dcd_22_4 y dcd_22_19 parecían presentar alguna construcción aberrante. Sin embargo, el resto de colonias era compatible con tener la construcción deseada. Se escogió la colonia dcd_22_9, y su producto de PCR fue secuenciado para confirmar la correcta construcción y detectar si se había generado alguna mutación puntual o algún corrimiento de marco.

El resultado del alineamiento de la secuencia obtenida contra la secuencia teórica esperada se muestra a continuación:

```

#####
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: Expected_seq
# 2: Actual_seq
# Matrix: EBL0SUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 620
# Identity: 619/620 (99.8%)
# Similarity: 619/620 (99.8%)
# Gaps: 0/620 ( 0.0%)
# Score: 3829.0
#
#####
Expected_seq 1 ACTTTAAGAAAGGAGATATAAAGCGTCTGTGTGACCGAGATATTGAAG 50
Actual_seq 1 ACTTTAAGAAAGGAGATATAAAGCGTCTGTGTGACCGAGATATTGAAG 50
Expected_seq 51 CCTGGCTTGATGAAGCCGTTTGTGATCAACCCACGTCGCGCCAGTGGAG 100
Actual_seq 51 CCTGGCTTGATGAAGCCGTTTGTGATCAACCCACGTCGCGCCAGTGGAG 100
Expected_seq 101 CGTATTAAACGGCCGACCGTGGATGACGCGCTGGGCAATAAATTCGTAC 150
Actual_seq 101 CGTATTAAACGGCCGACCGTGGATGACGCGCTGGGCAATAAATTCGTAC 150
Expected_seq 151 CTTCGGTGTCAACGGCAGCGTTTATGATCTGAGCGTCCCAAGATG 200
Actual_seq 151 CTTCGGTGTCAACGGCAGCGTTTATGATCTGAGCGTCCCAAGATG 200
Expected_seq 201 AAGTGAGCGCCGCGCTTGACCGCGTATGAGCGATGAGATCGTTCTCGAC 250
Actual_seq 201 AAGTGAGCGCCGCGCTTGACCGCGTATGAGCGATGAGATCGTTCTCGAC 250
Expected_seq 251 GAGGCGAGGCGTTCTATCTTACCCAGGAGAGCTGGCGCTGGCGGTGAC 300
Actual_seq 251 GAGGCGAGGCGTTCTATCTTACCCAGGAGAGCTGGCGCTGGCGGTGAC 300
Expected_seq 301 GCTGAGTGTGAGCTGCGCTGCGCCAGCGATCTGTTGGCTGGCTGACGGGC 350
Actual_seq 301 GCTGAGTGTGAGCTGCGCTGCGCCAGCGATCTGTTGGCTGGCTGACGGGC 350
Expected_seq 351 GTTCCTCACTGGCGCGTCTGGGGCTGATGTGCAGCTCACCGCGCACCGC 400
Actual_seq 351 GTTCCTCACTGGCGCGTCTGGGGCTGATGTGCAGCTCACCGCGCACCGC 400
Expected_seq 401 ATCGATCCGGGCTGGTCTGGTTGCATTGTGCTGGAGTCTACAACCTCGG 450
Actual_seq 401 ATCGATCCGGGCTGGTCTGGTTGCATTGTGCTGGAGTCTACAACCTCGG 450
Expected_seq 451 TAAGTCGCGCTGGCGCTGCGTCCGGGCATGTTAATTGGTGGCTGAGCT 500
Actual_seq 451 TAAGTCGCGCTGGCGCTGCGTCCGGGCATGTTAATTGGTGGCTGAGCT 500
Expected_seq 501 TTGAGCCGCTTCCGGCCCGGCGCTGGGACCTTACAAACCGCCGTGAAGAT 550
Actual_seq 501 TTGAGCCGCTTCCGGCCCGGCGCTGGGACCTTACAAACCGCCGTGAAGAT 550
Expected_seq 551 GCGAATATCGCAACAGCAGGGCGCGGTAGCCAGCCGAATCGATAAGA 600
Actual_seq 551 GCGAATATCGCAACAGCAGGGCGCGGTAGCCAGCCGAATCGATAAGA 600
Expected_seq 601 CTAAATGCGAATTGAGC 620
Actual_seq 601 CTAAATGCGAATTGAGC 620
#####
#
#
#
#####

```

Imagen 20. Alineamiento entre la secuencia obtenida del clonaje del gen dcd de *E. coli* y la secuencia publicada

El alineamiento obtenido cubre la totalidad del gen así como algunas bases correspondientes a las regiones flanqueantes al punto de inserción en el plásmido. En el alineamiento se aprecia que la inserción se logró con éxito en el punto de interés sin ninguna mutación que ocasionara corrimiento del marco de lectura ni la pérdida de ninguna secuencia de interés. Se aprecian las dianas recompuestas para NdeI y BamHI (indicadas en color verde). Adicionalmente, se aprecia que el apareamiento entre las bases del gen es prácticamente perfecto con la secuencia que aparecía en la base de datos, detectándose únicamente una base diferente (T503C) la cual comporta un cambio aminoacídico de una valina por una alanina (V168A), esta mutación se considera creíble y un cambio menor, ya que ambos aminoácidos son apolares y presentan unas propiedades muy parecidas.

Con este alineamiento quedó confirmada la correcta construcción del plásmido de expresión recombinante, al cual se le denominó pET22 b(+)_EcodCTPd.

2.2.4. Clonaje del gen *cdd* de *Escherichia coli* en pET22 b(+)

Las bandas recortadas del gel se copurificaron y se utilizaron para clonar dentro del vector de expresión pET22 b(+)_linealizado. Una vez realizada la ligación y la transformación en *E. coli* TOP10, en las placas sembradas con el producto de la reacción de transformación se apreció una única colonia (*cdd_22_1*) que se confirmó por *miniprep* y posterior PCR, apreciándose el resultado mostrado en la Imagen 21. El tamaño esperado para el producto de PCR de un recombinante positivo es de ≈ 1100 pb y para un resultado no recombinante es de unos 200 a 300 pb.

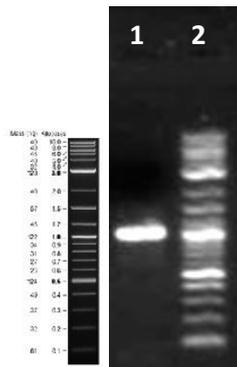


Imagen 21. Análisis electroforético del producto de PCR para la confirmación de la inserción del gen *cdd* de *E. coli* en pET22 b(+). Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carril 1: producto de PCR; Carril 2: marcador.

Se aprecia en el gel que la PCR funcionó bien y que rindió una banda pura compatible con ser el producto esperado. Por lo que el producto de PCR se secuenció para confirmar la correcta construcción y detectar si se había generado alguna mutación puntual o algún corrimiento de marco.

El resultado del alineamiento de la secuencia obtenida contra la secuencia teórica esperada se muestra a continuación:

```

#####
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: Expected_seq
# 2: Actual_seq
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 923
# Identity:      922/923 (99.9%)
# Similarity:   922/923 (99.9%)
# Gaps:         0/923 ( 0.0%)
# Score: 5618.0
#
#####
Expected_seq  1 ACTTTAAGAAGGAGATATAATGTCATCCACGTTTTCAAACCGCTTTG  50
Actual_seq    1 ACTTTAAGAAGGAGATATAATGTCATCCACGTTTTCAAACCGCTTTG  50
Expected_seq  51 CCCAACTTGGGATAAAGTGCATCTGCACCTGGAACCTATTCTGGCAGAC  100
Actual_seq    51 CCCAACTTGGGATAAAGTGCATCTGCACCTGGAACCTATTCTGGCAGAC  100
Expected_seq  101 AAGTACTTCCCGCTTTGTTGACCGGGAGCAAGTCTCATCGTGAAGAG  150
Actual_seq    101 AAGTACTTCCCGCTTTGTTGACCGGGAGCAAGTCTCATCGTGAAGAG  150
Expected_seq  151 CGCAACGGGCTGGACGAAGACGCGCTGGCACTTCGCACTACTTCGCTGG  200
Actual_seq    151 CGCAACGGGCTGGACGAAGACGCGCTGGCACTTCGCACTACTTCGCTGG  200
Expected_seq  201 CGCGGCTTGTGCGCTACGCCATTGTCGAATTTAAATGTTGGCGCAATT  250
Actual_seq    201 CGCGGCTTGTGCGCTACGCCATTGTCGAATTTAAATGTTGGCGCAATT  250
Expected_seq  251 GCGCGGGTGTGAGCGGAACCTGGTATTTCGGTGCCTAATGGAATTAT  300
Actual_seq    251 GCGCGGGTGTGAGCGGAACCTGGTATTTCGGTGCCTAATGGAATTAT  300
Expected_seq  301 TGGTGCACAATGACGAACCGTTTCATGCGAACAAGGCGGATCAGCC  350
Actual_seq    301 TGGTGCACAATGACGAACCGTTTCATGCGAACAAGGCGGATCAGCC  350
Expected_seq  351 ACGCTGGTGTGAGTGTGAAAAAGCGCTTCAGCCATCAGCGTTAACTAC  400
Actual_seq    351 ACGCTGGTGTGAGTGTGAAAAAGCGCTTCAGCCATCAGCGTTAACTAC  400
Expected_seq  401 ACGCTTGTGTGCTCAGTCCGCTCAAGTTTATGAATGAATGAACAGCAGTCT  450
Actual_seq    401 ACGCTTGTGTGCTCAGTCCGCTCAAGTTTATGAATGAATGAACAGCAGTCT  450
Expected_seq  451 GSACTGCGTATTCACTTCGCGGGCGGAGGACACGCGCTGGTACT  500
Actual_seq    451 GSACTGCGTATTCACTTCGCGGGCGGAGGACACGCGCTGGTACT  500
Expected_seq  501 ATCTGCCAGATGCTTTGGGCGAAGATCTGGAGATTAANAACGCTGCTG  550
Actual_seq    501 ATCTGCCAGATGCTTTGGGCGAAGATCTGGAGATTAANAACGCTGCTG  550
Expected_seq  551 ATGAGCAACAGGATCAGCGCTATGCGCTGACGGGTGATGCGCTTTCTCA  600
Actual_seq    551 ATGAGCAACAGGATCAGCGCTATGCGCTGACGGGTGATGCGCTTTCTCA  600
Expected_seq  601 GGCAGGATTCGCGCGCAACCGTTCCACATGCTTACAGTAAGTCCG  650
Actual_seq    601 GGCAGGATTCGCGCGCAACCGTTCCACATGCTTACAGTAAGTCCG  650
Expected_seq  651 CAAGCGGTGCGCGCTGGAATGTAAGAGCGTCTGATTTTCAAGTCCAGC  700
Actual_seq    651 CAAGCGGTGCGCGCTGGAATGTAAGAGCGTCTGATTTTCAAGTCCAGC  700
Expected_seq  701 TACGCTGAAAACCGCGCATTCAACCGGACTCTGCCACCGTTGCAGGGAGC  750
Actual_seq    701 TACGCTGAAAACCGCGCATTCAACCGGACTCTGCCACCGTTGCAGGGAGC  750
Expected_seq  751 GTTAATTCGTTGAATCTCAAGGGTATGATTACCGGATATCCAGCGCG  800
Actual_seq    751 GTTAATTCGTTGAATCTCAAGGGTATGATTACCGGATATCCAGCGCG  800
Expected_seq  801 CGGTTCTGGCAGAAAAGCGGATGCGCGTTGATTCAAGTGGGATGCCACC  850
Actual_seq    801 CGGTTCTGGCAGAAAAGCGGATGCGCGTTGATTCAAGTGGGATGCCACC  850
Expected_seq  851 TCCGCAACCGCTGAAAGCTCTCGGCTGTACAGTATCGACCGAGTCTTCT  900
Actual_seq    851 TCCGCAACCGCTGAAAGCTCTCGGCTGTACAGTATCGACCGAGTCTTCT  900
Expected_seq  901 CGCTTAAAGTGAATTCGAGC  923
Actual_seq    901 CGCTTAAAGTGAATTCGAGC  923
#####

```

Imagen 22. Alineamiento entre la secuencia obtenida del clonaje del gen *cdd* de *E. coli* y la secuencia publicada

El alineamiento obtenido cubre la totalidad del gen así como algunas bases correspondientes a las regiones flanqueantes al punto de inserción en el plásmido. En el alineamiento se aprecia que la inserción se logró con éxito en el punto de interés sin ninguna mutación que ocasionara corrimiento del marco de lectura ni la pérdida de ninguna secuencia de interés. Se aprecian las dianas recompuestas para NdeI y BamHI (indicadas en color verde). Adicionalmente, se aprecia que el apareamiento entre las bases del gen es prácticamente perfecto con la secuencia que aparecía en la base de datos, detectándose únicamente una base diferente (C614T) la cual comporta un cambio aminoacídico de una prolina por una leucina (P205L). Esta mutación se considera creíble y menor ya que ambos aminoácidos pertenecen al grupo de aminoácidos apolares y poseen unas propiedades muy parecidas.

Con este alineamiento quedó confirmada la correcta construcción del plásmido de expresión recombinante, al cual se le denominó pET22 b(+)_EcoCDA.

2.3. Custodia de las cepas

2.3.1. Custodia de las cepas de clonaje

Las mismas colonias que se usaron para preparar las *minipreps* que fueron confirmadas se usaron para preparar *stocks* de almacenaje a largo plazo de las cepas de clonaje. Estos *stocks* fueron identificados como:

Escherichia coli TOP10_pET22b(+)_EcodCTPd

Escherichia coli TOP10_pET22b(+)_EcoCDA

2.3.2. Generación y custodia de las cepas de expresión

Las mismas *minipreps* que se utilizaron como molde para las PCRs de confirmación y secuenciación se utilizaron, una vez confirmadas, para transformar células competentes de la cepa *E. coli* BL21(DE3). El cultivo líquido de las transformaciones se utilizó para preparar *stocks* de las cepas de expresión, identificadas como:

Escherichia coli BL21(DE3)_pET22b(+)_EcodCTPd

Escherichia coli BL21(DE3)_pET22b(+)_EcoCDA

3. Producción de los biocatalizadores

3.1. Expresión piloto de las proteínas recombinantes

3.1.1. Expresión piloto de EcodCTPd

Las muestras tomadas durante la inducción piloto de EcodCTPd se cargaron en un gel SDS-PAGE; los resultados se muestran en la Imagen 23. El tamaño esperado para la proteína de interés es de 21,25 kDa.

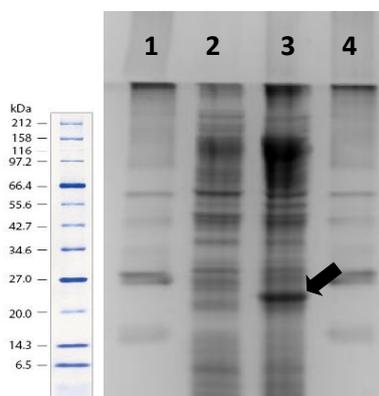


Imagen 23. Inducción piloto de EcodCTPd. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carriles 1 y 4: marcador; Carril 2: C- de expresión a las 3 h post-inducción; Carril 3: EcodCTPd a las 3 h post-inducción.

En la expresión piloto se aprecia una banda clara. Aún siendo menos intensa que la inducción de EcoCDA, como se ha comentado en los métodos, con el material recuperado de esta inducción se obtuvo suficiente enzima como para efectuar las pruebas de concepto y, dado que finalmente se descartó el uso de este enzima, no se realizó ninguna prueba adicional de producción, ni a pequeña escala ni en reactor, siendo ésta la única inducción de este gen que se realizó.

3.1.2. Expresión piloto de EcoCDA

Las muestras tomadas durante la primera inducción piloto de EcoCDA se cargaron en un gel SDS-PAGE y los resultados se muestran en la Imagen 24. El tamaño esperado para la proteína de interés es de 32 kDa.

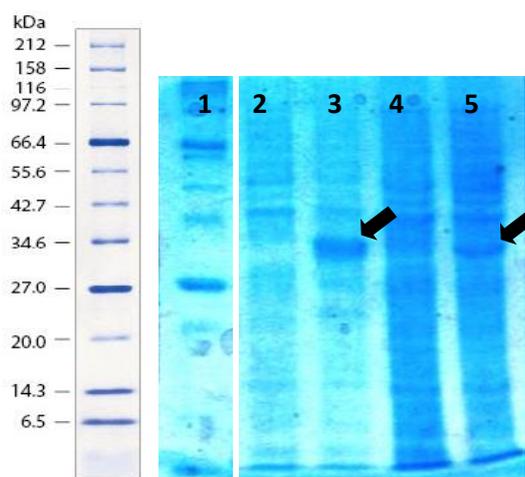


Imagen 24. Inducción piloto de EcoCDA. Izquierda: patrón de bandas esperado del marcador de peso. Derecha: gel. Carril 1: marcador; Carril 2: C- de expresión a las 4 h post-inducción; Carril 3: EcoCDA a las 4 h post-inducción; Carril 4: C- de expresión O/N; Carril 5: EcoCDA O/N.

En la expresión piloto se pudo apreciar una clara expresión de la proteína de interés, la cual fue más evidente a las 4 horas post-inducción que tras la inducción O/N.

3.2. Producción, a escala de laboratorio, del EcoCDA

En la producción de rutina a pequeña escala se mantuvieron únicamente durante 3 horas las inducciones, en la Imagen 25, se muestra el resultado para uno de los lotes producidos en tales condiciones.

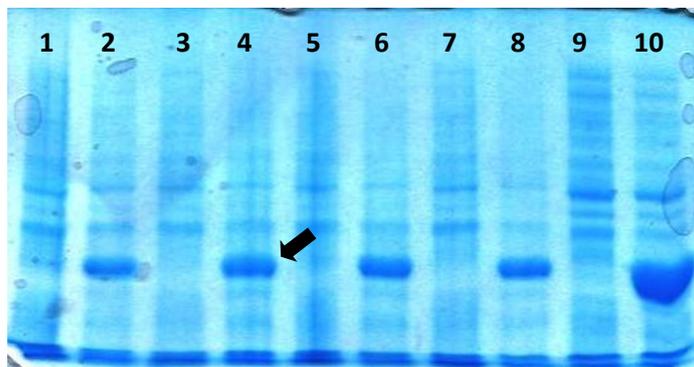


Imagen 25. Inducción de EcoCDA. Carril 1: C- de expresión a la 1 h post-inducción; Carril 2: EcoCDA a la 1 h post-inducción; Carril 3: C- de expresión a las 2 h post-inducción; Carril 4: EcoCDA a las 2 h post-inducción; Carril 5: C- de expresión a las 2,5 h post-inducción; Carril 6: EcoCDA a las 2,5 h post-inducción; Carril 7: C- de expresión a las 3 h post-inducción; Carril 8: EcoCDA a las 3 h post-inducción; Carril 9: SN sonicado del C- de expresión a las 3 h post-inducción; Carril 10: SN sonicado de EcoCDA a las 3 h post-inducción.

En la imagen del gel se puede apreciar que la expresión de la proteína alcanza un máximo a las 2 horas post-inducción, aun manteniéndose estable durante los siguientes muestreos. Adicionalmente, en la muestra sonicada se aprecia que la cantidad de proteína soluble es muy alta, por lo que el método de procesado sirve tanto para recuperar la proteína como para concentrarla.

4. Pruebas de concepto biocatalíticas preliminares

4.1. Pruebas de concepto preliminar con EcodCTP

La primera aproximación en condiciones de prueba de concepto se realizó con la enzima EcodCTP directamente sobre el intermedio 3.2 del sofosbuvir que se pretendía transformar. En concreto, las condiciones de esta PoC fueron las indicadas:

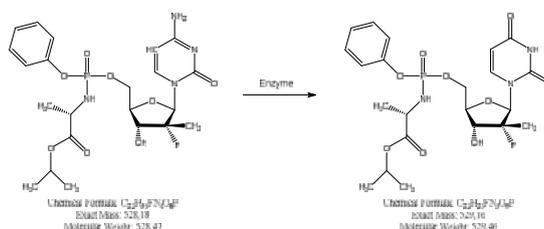


Imagen 26. Representación de la reacción probada en condiciones de PoC con la enzima EcodCTP

- Concentración de sustrato 3.2: 7,5 mM
- Cantidad de enzima (presentación líquida): 1 % v/v
- Medio de reacción: tampón fosfato 30 mM pH 7
- Volumen de reacción: 1 ml
- Temperatura de reacción: 37 °C
- Agitación : No
- Tiempo de reacción: 24 h

El resultado de esta reacción fue analizado por HPLC pero no se observó ningún avance de la reacción, por lo que se consideró que, a pesar de que todo indicaba que la reacción no era posible, debía repetirse incorporando en paralelo una reacción control. Esta reacción control que se incorporó en la repetición de la PoC fue la desaminación de la 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato. Este compuesto es el sustrato natural de la enzima usada, por lo que se esperaba que sirviera como reacción tipo para determinar si la enzima estaba funcionando bien, y por tanto la reacción sobre 3.2 era inviable, o si la enzima se había expresado en forma inactiva. Esta reacción control se realizó en las mismas condiciones que la PoC indicada para el intermedio 3.2. La reacción propuesta como control se muestra en la siguiente imagen.

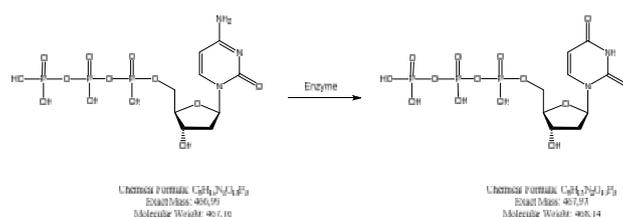


Imagen 27. Representación de la reacción tipo establecida para la enzima EcodCTP

La repetición de la reacción de PoC con el intermedio 3.2 con la adición de la reacción control demostró que la enzima sí estaba operativa, pero que era incapaz de reconocer el intermedio 3.2, por lo que se desestimó continuar realizando pruebas con esta enzima.

4.2. Pruebas de concepto preliminar con EcoCDA

En vista que la enzima EcodCTP no había mostrado actividad sobre el intermedio 3.2 se decidió probar la enzima EcoCDA, a pesar que la bibliografía desaconsejaba el uso de estas enzimas para el reconocimiento de sustratos con sustituyentes voluminosos en 5'⁸. La reacción que se probó fue la misma indicada en la Imagen 26 y en las mismas condiciones indicadas. El análisis por HPLC de esta reacción de EcoCDA sobre el intermedio 3.2 mostró una conversión cuantitativa del sustrato, por lo que se decidió seguir adelante con esta enzima para todo el desarrollo del proceso. Este hecho resultó tan sorprendente que se realizaron algunas pruebas adicionales para confirmar la capacidad enzimática sobre algunos otros sustratos portadores de modificaciones organofosforadas similares en 5', confirmándose en todos los casos la actividad de la enzima sobre los sustratos. Estos resultados (no mostrados aquí) llevaron a la solicitud de una patente europea para proteger industrialmente el proceso⁹. Esta patente ha sido aprobada en Europa y China y está actualmente en trámite en EEUU, Canadá, Japón, Corea y México.

⁸ Faivre-Nitsche, S.E. et al. (1999) Eur. J. Biochem. 263, 896-903

⁹ EP3271468B1

5. Estudio de la posible purificación de la enzima

Se decidió probar si era factible conseguir una presentación más pura del biocatalizador. Para ello se tomó una muestra líquida del extracto enzimático y se probó una precipitación salina fraccionada, ya que se contaba en el grupo con experiencia previa en este tipo de purificaciones. La muestra se trató con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración final de un 20% (p/v) y se dejó precipitando en hielo durante 2 horas. Tras este tiempo se centrifugó para separar el sobrenadante (SN) del sedimento (pellet). El SN de la precipitación con 20 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se suplementó con un 10 % adicional de la sal y se repitió la incubación en frío y la centrifugación. Las muestras de este proceso de precipitación se analizaron en un gel SDS-PAGE y los resultados se muestran a continuación.

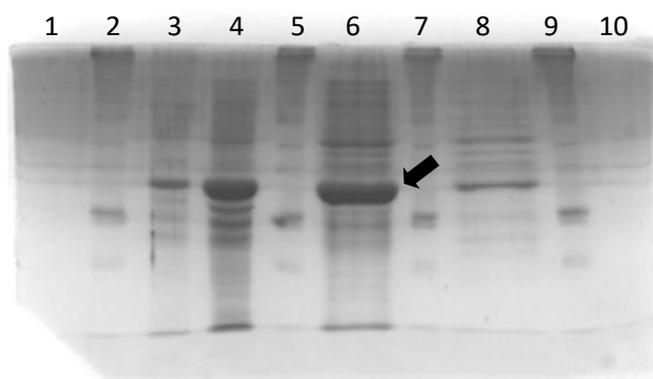


Imagen 28. Análisis SDS-PAGE de las pruebas de precipitación fraccionada. Carriles 1 y 10: vacíos; Carriles 2, 5, 7 y 10: Marcador de peso molecular; Carril 3: Pellet precipitación con 20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Carril 4: Pellet precipitación con 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Carril 6: SN precipitación con 20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Carril 8: SN precipitación con 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

A la vista de los resultados se apreció que no se consigue una fracción especialmente limpia del catalizador con el proceso descrito pero la que la recuperación es muy buena. El proceso se dejó como posible proceso de semipurificación alternativo a otras opciones como la cromatografía, aunque no se ahondó más en este punto dado que durante el proceso de optimización de la reacción de interés no se detectaron impurezas relevantes atribuibles al biocatalizador.

6. Escalado de la producción enzimática

6.1. Adaptación del sistema de expresión (cepa/plásmido)

Como desde el inicio se concibió este proyecto con una clara vocación industrial, antes de desarrollar un proceso de escalado, se tuvieron en consideración algunas posibles consecuencias comerciales futuras. En concreto se estudió las posibles limitaciones que podía tener la producción del biocatalizador. Las pruebas realizadas hasta el momento se habían realizado utilizando un sistema de expresión comercial. Esto es, como se ha comentado más arriba, el clonaje del gen de interés dentro del plásmido de expresión pET22 b(+) y esta construcción recombinante transformada en la cepa de expresión BL21(DE3) de *Escherichia coli*. Esta combinación de plásmido + cepa utiliza el sistema de

expresión conocido como T7/lac. En este sistema de expresión, el gen clonado está regulado bajo el promotor del fago T7, y la ARN polimerasa necesaria para reconocer este promotor está codificada en un gen cromosómico en la cepa hospedadora controlado a su vez por el promotor lac (P_{lac}). De esta manera, en el momento en que se induce el cultivo con IPTG, se activa la expresión cromosómica de la ARN polimerasa de T7, la cual se encarga de la transcripción del gen de interés clonado en el plásmido. Todos los componentes de este sistema de expresión han estado sujetos a protección industrial por parte de patentes. Y aunque aparentemente estas patentes están ya caducadas, por lo menos esto es claro para el sistema T7/lac en sí mismo, el hecho es que en el momento de la adquisición comercial tanto del plásmido (Novagen, Merck) como de la cepa (Invitrogen), se acepta tácitamente el compromiso contractual de su uso estrictamente para investigación (*For research only*). Para el caso que nos ocupa, se intentó el contacto con Novagen para conseguir una licencia de explotación comercial de la proteína producida usando este plásmido, pero no se logró ninguna propuesta concreta tras múltiples contactos. En el caso de Invitrogen, no se obtuvo respuesta alguna.

Llegados a este punto se planteó la posibilidad de desarrollar internamente un sistema propio de expresión recombinante en condiciones FTO, que no pudiera estar sujeto a futuras limitaciones comerciales.

Por un lado se incorporó en el laboratorio una cepa de *Escherichia coli* adquirida a la CECT con un acuerdo de licencia no exclusiva para la realización de una explotación comercial de la cepa. En concreto, la cepa licenciada fue la CECT 7619 (K12 "wildtype"). La elección de esta cepa fue por ser una cepa GRAS y por ser ampliamente conocida, estando su genoma secuenciado y anotado. Sin embargo, esta cepa salvaje se consideró que era arriesgado utilizarla para la producción de proteínas recombinantes por ser poseedora de dos proteasas inespecíficas (Lon y OmpT). La presencia de estas proteasas se consideró que podía repercutir negativamente en la productividad de la enzima heteróloga ya que, si bien la enzima podría producirse, podía degradarse rápidamente, incluso con las células ya lisadas durante el proceso de recogida, representando un problema de estabilidad de la enzima. Por todo ello se procedió a realizar un doble KO sobre ambas proteasas utilizando el método conocido como "*recombineering*". Esta cepa generada se custodió en el laboratorio identificada como:

Escherichia coli KO_02

Aunque esta cepa fue generada inicialmente para este proyecto, quedó almacenada en la colección de cepas del laboratorio y fue utilizada posteriormente para otros proyectos.

Por otro lado, para la construcción del plásmido, se contó con el servicio de una empresa de síntesis de ADN ([Atum Bio](#)). Esta empresa ofrece servicios de síntesis de fragmentos de ADN bajo demanda

con opción de ser entregados al cliente insertados en un plásmido de expresión bajo un contrato de licencia FTO. Adicionalmente, esta empresa ofrece un servicio de optimización de codones para mejorar la expresión recombinante y la posibilidad de utilizar diferentes sistemas de expresión. En este caso, dado que la cepa KO_02 no es una cepa (DE3) y no es compatible con el sistema T7, se escogió el uso del promotor de T5 inducible por IPTG, el cual es reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*. Este plásmido fue transformado dentro de la cepa KO_02, generando así la cepa productora de EcoCDA, y conservada en el laboratorio identificada como:

Escherichia coli KO_02_ pD441-SR_EcoCDA

6.2. Preparación de un banco celular

Una vez desarrollada la cepa de expresión se realizó un banco celular caracterizado y homogéneo para poder disponer de la cepa en condiciones reproducibles cada vez que fuera requerida. La caracterización del banco incluyó parámetros tales como recuento celular, pureza, estabilidad del plásmido, identidad y potencia de la proteína recombinante. Este banco celular se produjo en medio de cultivo TB (receta estándar) en fase exponencial de crecimiento, y fue conservado a -80°C alicuotado en viales monouso con 1 ml/vial. Se obtuvieron un total de 90 viales.

6.3. Estudio de la escalabilidad y reproducibilidad del proceso de fermentación

Una vez preparado el banco celular y caracterizado se realizaron pruebas de escalabilidad de producción del biocatalizador utilizando la nueva cepa en escala de reactor piloto, a 4 litros en formato lote alimentado. Se realizaron tres lotes adaptando un proceso estándar previamente incorporado en el laboratorio. Estos tres lotes se evaluaron para poder estimar la reproducibilidad del proceso y la posibilidad de su producción a escala comercial.

En la siguiente tabla se resumen los resultados de los controles de proceso.

Tabla 25. Parámetros más representativos de la productividad de EcoCDA en los tres cultivos de prueba en reactor en régimen de lote alimentado

Parámetro	Lote #1	Lote #2	Lote #3
Abs ₆₀₀ inóculo	3,25	2,60	3,30
Abs ₆₀₀ inicio alimentación	41,0	49,5	49,0
Abs ₆₀₀ final alimentación exponencial	56	64	60
Abs ₆₀₀ final cultivo	60	86	72
Peso húmedo de biomasa obtenido (g/l)	76,82	133,55	84,17
Abs ₆₀₀ pellet resuspendido	94	99	92
Volumen lisado recogido (ml)	2000	3600	2800
Volumen SN recuperado (ml)	1600	3000	2500
Volumen retenido clarificación (ml)	295	600	270
Volumen filtrado clarificación (ml)	1235	2320	2100
Cantidad de proteína diana en el producto final (mg/ml)	3,43	4,25	6,54
Potencia del producto final obtenido (UA/ml)	6493	6157	7817

Como se aprecia en la Tabla 25, aunque las tres fermentaciones presentaron cierta variabilidad, se consideró que la productividad era suficiente para continuar con el desarrollo del proyecto, por lo que se utilizó el método propuesto para la producción del enzima EcoCDA.

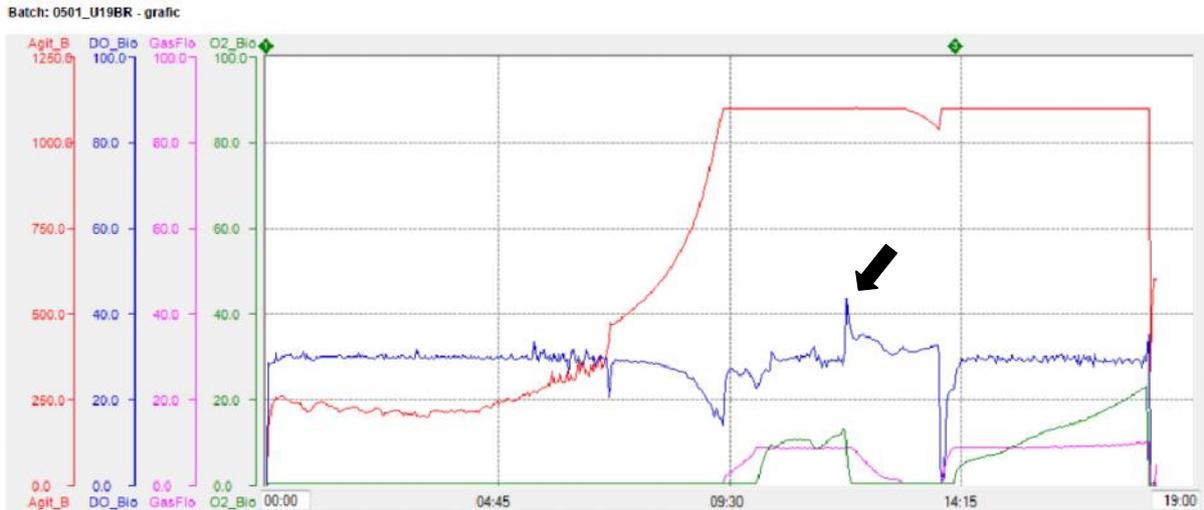


Imagen 29. Gráfico de control de uno de los cultivos en biorreactor en que se puede apreciar la evolución de la agitación, el oxígeno disuelto y los flujos de aire y de oxígeno puro. Se indica con una flecha el momento en que acabó la fase den batch y se inició la fase de alimentación e inducción.

6.4. Estudio de estabilidad del biocatalizador

Con objetivo de conocer mejor el biocatalizador, así como de definir cuál debería ser su presentación, se propuso realizar un estudio de estabilidad. Inicialmente se planteó un estudio de estabilidad con controles semanales del material obtenido filtrado por 0,45 μm y conservado a temperatura ambiente (RT), a 2-8 $^{\circ}\text{C}$ y a -20 $^{\circ}\text{C}$. La estabilidad del catalizador en estas condiciones fue evaluada por SDS-PAGE, actividad enzimática y biocarga. Este estudio no llegó a concluirse porque en los primeros controles se evidenció que el catalizador no era estable a RT ni a 2-8 $^{\circ}\text{C}$, incluso a -20 $^{\circ}\text{C}$ la bajada de la actividad fue notable. Estos resultados se atribuyeron a la elevada biocarga que tenía el catalizador obtenido según el proceso descrito.

Estos resultados llevaron a que se incorporara un paso final de filtración esterilizante por un filtro de 0,22 μm . Con este nuevo material se realizó un nuevo estudio de estabilidad, manteniendo esta vez las muestras de estabilidad a -20 $^{\circ}\text{C}$, -80 $^{\circ}\text{C}$ y a RT en formato liofilizado. En vista de las nuevas condiciones de almacenamiento, se cambiaron también los puntos de muestreo, los cuales se tomaron a las 24 h, 1 mes, 2 meses, 3 meses y 6 meses. Los resultados de actividad de este estudio de estabilidad se muestran a continuación.

Tabla 26. Resultados de actividad del estudio de estabilidad del catalizador expresados en % de recuperación por comparación con el primer punto del muestro

Tiempo de muestreo	24 h			1 mes			2 meses			3 meses			6 meses		
Condiciones	-20 °C	-80 °C	RT	-20 °C	-80 °C	RT	-20 °C	-80 °C	RT	-20 °C	-80 °C	RT	-20 °C	-80 °C	RT
% recuperación de actividad	100	100	100	85	96	95	65	94	92	83	95	94	79	96	95

Como se puede observar en la Tabla 26, el catalizador demostró ser estable en condiciones de congelación a -80 °C y en formato liofilizado, siendo la temperatura de -20°C insuficiente para su estabilidad.

7. Desarrollo del método de determinación de la actividad tipo

7.1. Definición del método analítico

Una vez obtenido el biocatalizador y, más allá de su demostración de operabilidad a nivel de PoC, se requería la definición de un método de determinación de la actividad tipo del enzima para poder estandarizar las condiciones de reacción. Este método se consideró clave para poder comparar lotes de enzima, así como para poder realizar el desarrollo del proceso de la síntesis del compuesto de interés con garantías. Como reacción tipo para el enzima EcoCDA, se definió la desaminación de dC a dU. Para optimizar este método de determinación de actividad, se debía primero establecer el método analítico de HPLC para, posteriormente, poder determinar las condiciones de reacción.

En las condiciones del método por HPLC optimizado, la dC eluye a $t_r = 8,1$ minutos y la dU a $t_r = 10,9$ minutos, y ambos compuestos demostraron ser estables en la fase móvil de análisis.

Con este método HPLC se realizó una recta de calibrado a ocho puntos en el rango de concentraciones de 20 a 600 ppm para dU.

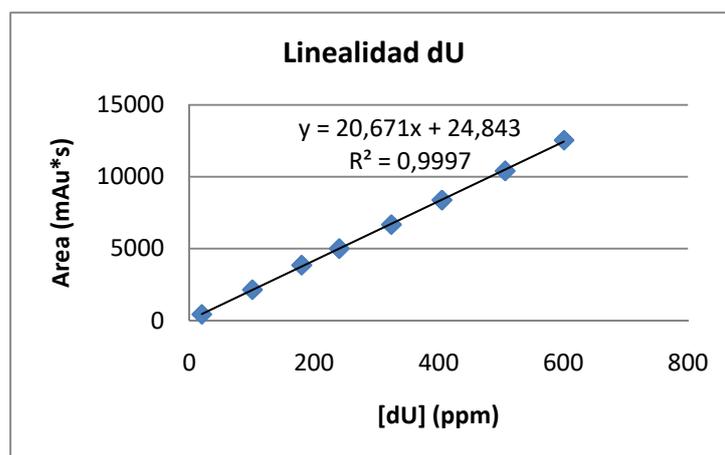


Imagen 30. Recta patrón para dU con el método analítico optimizado

Tras la optimización del método, se determinó que durante el análisis de las muestras, después de 6-8 inyecciones con el método isocrático, se inyectaría un blanco con un método en gradiente de agua/metanol hasta un 10/90 para limpiar la columna de posibles contaminantes de las muestras, si los hubiera.

7.2. Definición del método de detención de la reacción de actividad

Los análisis por HPLC de las muestras generadas indicaron que a la concentración de enzima de 5 µg proteína total/ml se necesitaban porcentajes de metanol iguales o superiores al 70% para detenerla, ya que a porcentajes inferiores se observa presencia de dU en el medio. Adicionalmente, en la muestra detenida con un 80% de metanol se apreció un precipitado claro compatible con la precipitación del sustrato, lo que era coherente con que a un porcentaje algo menor ya el enzima estuviera inactivo. Por lo tanto, en los siguientes ensayos de actividad, se definió detener la mezcla de reacción con un porcentaje de metanol del 70%.

7.3. Optimización determinación actividad enzimática

A partir del intervalo de linealidad obtenido para dU con el método HPLC isocrático se decidió que el punto medio de la recta, 250 ppm aproximadamente, fuera la concentración a alcanzar después de la detención de la reacción y de las diluciones adecuadas de la mezcla cuando hubiera, en un supuesto, un 50% de conversión a dU. La concentración de partida idónea para ello era 10 mM de dC y, a tenor de los resultados obtenidos, la mezcla de reacción se detendría añadiendo la cantidad de metanol suficiente para alcanzar un 70% en solución de dicho disolvente.

7.4. Exploración cinética enzimática (I)

El objetivo de esta primera exploración de la cinética enzimática era evaluar el comportamiento del enzima a lo largo del tiempo para determinar el tiempo óptimo de la reacción en las condiciones ensayadas. Se multiplicaron por 50 las concentraciones de sustrato y enzima que previamente se habían ensayado en un método de determinación de actividad mediante espectrofotometría. Este método espectrofotométrico no llegó a demostrarse útil por la elevada variabilidad y baja sensibilidad que presentó y no se muestra aquí, pero sirvió como punto de partida para las condiciones de optimización del método por HPLC, siendo las condiciones de reacción propuestas las siguientes:

- Concentración de sustrato dC: 9 mM
- Concentración de proteína total: 5 µg/ml
- Medio de reacción: tampón fosfato 100 mM pH 7
- Volumen de reacción: 2 ml
- Temperatura de reacción: 37 °C
- Agitación : No¹⁰
- Tiempo de reacción: a determinar (monitorización cada minuto durante 10 minutos)
- Detención de la reacción con 2,4 volúmenes de metanol

Así, para la monitorización de las reacciones (se realizó el experimento por duplicado, rx.1 y rx.2) se tomaron 100 µl de crudo de reacción y se mezclaron con 240 µl de metanol. Cada control se diluyó 1/3 en agua (100 µl muestra + 200 µl de agua) y se filtró por filtros de 10 kDa mediante centrifugación, siendo el filtrado el que se analizó por HPLC según el método optimizado.

Se realizaron blancos de reacción a 1, 5 y 10 minutos, donde se mezcló y atemperó el sustrato dC y aparte el producto final dU en las condiciones de reacción, en ausencia de enzima, y diluyéndolos en metanol y agua como las muestras de reacción.

A partir de las áreas obtenidas para las muestras analizadas por HPLC se calcularon las unidades de actividad (UA) por ml de extracto recuperadas en función del tiempo para ambas réplicas, según se muestran en la siguiente gráfica:

¹⁰ No se realizaron ensayos de actividad con agitación magnética pero no se consideró un parámetro crítico ya que el sustrato presentaba solubilidad total en la mezcla de reacción.

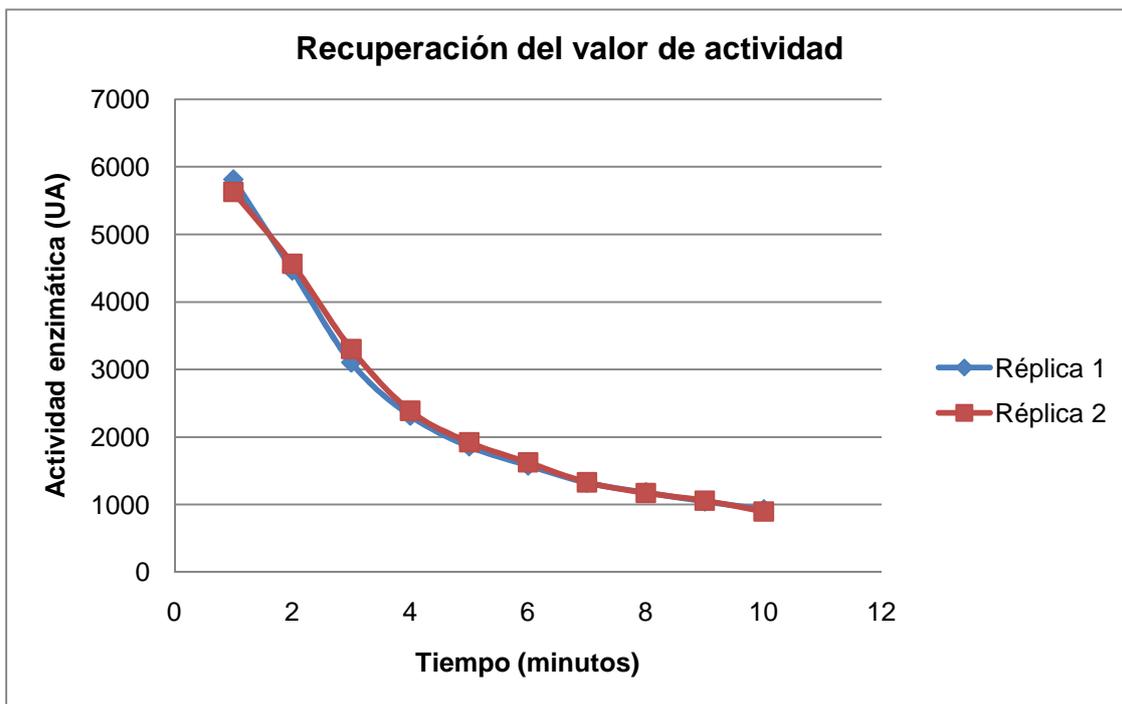


Imagen 31. Representación de la actividad enzimática del extracto a lo largo del tiempo cuando la concentración de proteína total en la reacción es de 5 µg/ml

En la representación se observa que a tiempos mayores se recuperan menos unidades de enzima, hecho representativo de la saturación de la reacción. Cromatográficamente se observó que el sustrato dC se consumía completamente antes de los 3 minutos de reacción. Si el método fuera robusto, es decir, que a cualquier tiempo de reacción se obtuviera el mismo valor de actividad, la gráfica esperada sería una línea recta con pendiente igual a cero. Ambas réplicas del experimento fueron reproducibles, sus curvas tienen el mismo comportamiento.

Los blancos de reacción mostraron que tanto sustrato como producto final eran estables en las condiciones de ensayo y detención de la reacción.

7.5. Exploración cinética enzimática (II)

A tenor de los resultados de la primera exploración de la cinética enzimática, se decidió disminuir la cantidad de proteína total inicial presente en la reacción, manteniendo la cantidad de sustrato dC para forzar una progresión más lenta de la reacción y conseguir así que la recuperación del número de UA fuera menos dependiente del tiempo de reacción.

Para ello, se realizaron dos nuevos experimentos, en las mismas condiciones de reacción que las descritas, con dos diluciones distintas del extracto enzimático EcoCDA_150417; una que

contenía 10 µg/ml (rx.3) y otra con 5 µg/ml (rx.4). Estas dos reacciones se monitorizaron cada minuto durante 10 minutos, de la misma manera descrita, y se analizaron por HPLC.

A partir de las áreas obtenidas de las muestras analizadas por HPLC se calcularon las unidades de actividad (UA) por ml de extracto recuperadas en función del tiempo para ambas reacciones así como los micromoles de dU formados a lo largo del tiempo.

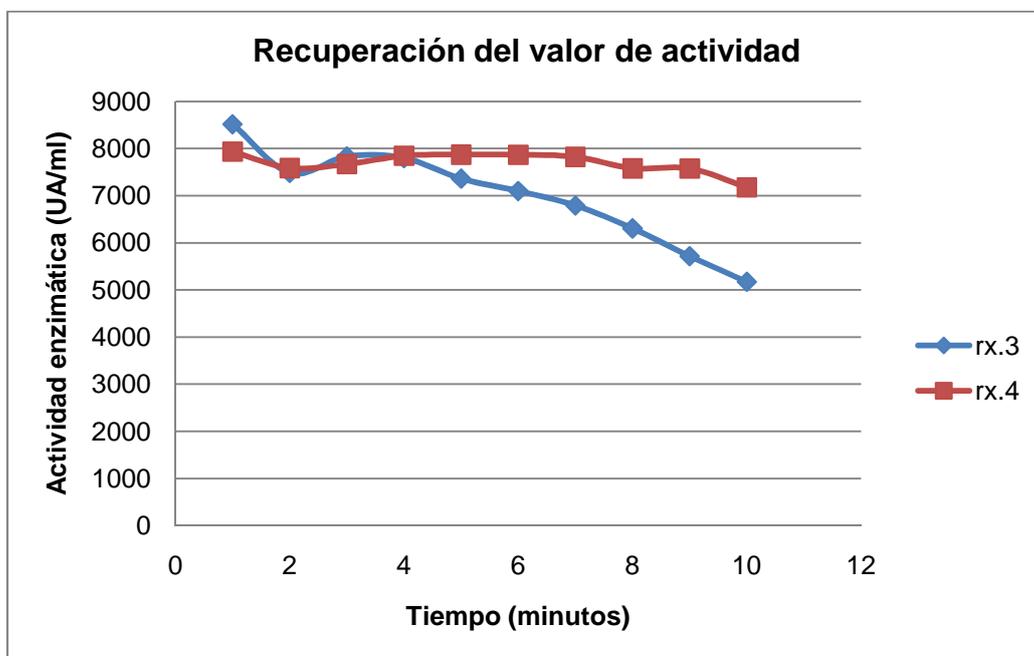


Imagen 32. Representación de la actividad a lo largo del tiempo cuando la concentración de proteína total en la reacción era de 1 µg/ml (rx.3) o de 0,5 µg/ml (rx.4)

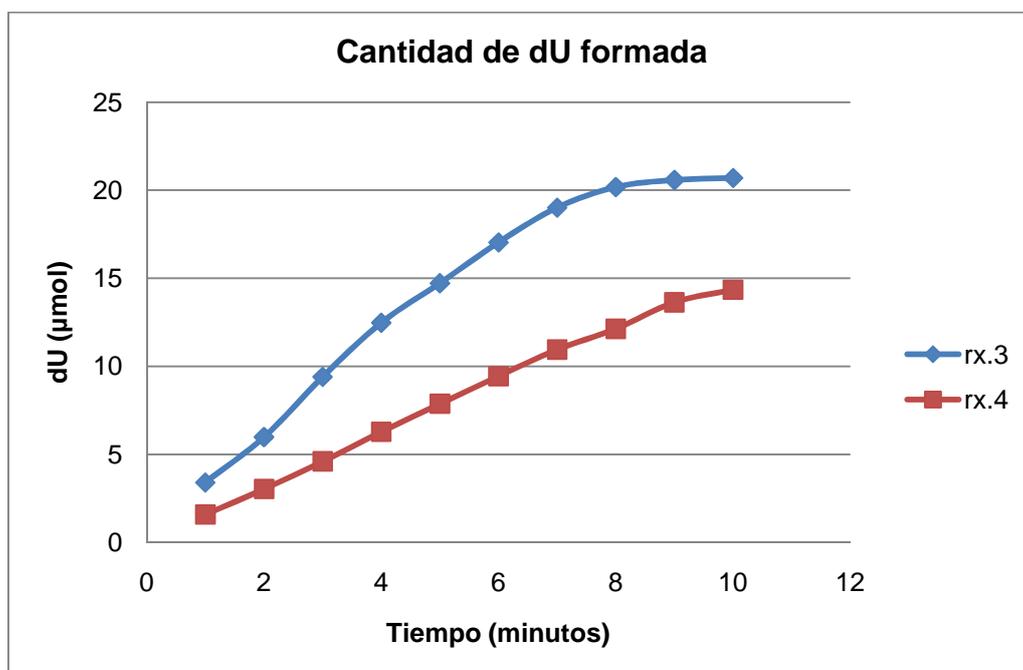


Imagen 33. Representación de la formación de dU a lo largo del tiempo cuando la concentración de proteína total en la reacción es de 1 µg/ml (rx.3) o de 0,5 µg/ml (rx.4)

En la Imagen 32 se observa que para rx.3 la pendiente de la recta aún no es cero, a diferencia de rx.4, aunque en el último minuto se observa cierta disminución. Este comportamiento se ve reflejado en la representación de la formación de dU a lo largo del tiempo, Imagen 33, donde se observa mayor linealidad en el experimento rx.4 que en el experimento rx.3 hasta el minuto 9.

De estos resultados se concluyó que se debía trabajar a concentraciones inferiores a 0,5 µg/ml de proteína total en la reacción para prolongar en el tiempo esa linealidad o pendiente cero en la recuperación de actividad. Por lo tanto, se asumió que había que preparar diluciones del extracto inferiores o iguales a 5 µg/ml de proteína total.

7.6. Exploración cinética enzimática (III)

Se decidió realizar cinco experimentos adicionales donde se modificó la concentración de proteína total en la reacción, disminuyendo este valor hasta 25 veces, con el fin de observar si la transformación del sustrato a producto final dU era lineal con el tiempo.

Así, los experimentos propuestos siguieron las mismas condiciones de reacción que las descritas, excepto la concentración del extracto enzimático:

Tabla 27. Parámetros de reacción de los ensayos rx.5 a rx.9

Nº rx	[sustrato] (mM)	[prot.total] (µg/ml)	Observaciones
5	9	0,5	Réplica de rx.4
6	9	0,2	-----
7	9	0,1	-----
8	9	0,05	-----
9	9	0,02	-----

Estas cinco reacciones se monitorizaron cada dos minutos durante 10 minutos y se analizaron por HPLC.

A partir de las áreas obtenidas de las muestras analizadas por HPLC se calcularon las unidades de actividad (UA) por ml de extracto recuperadas en función del tiempo para todos los

experimentos (ver Imagen 34) así como los micromoles de dU formados a lo largo del tiempo (ver Imagen 35).

La recuperación de UA fue constante independientemente del tiempo en los cinco experimentos ensayados (cada reacción presenta una recta con pendiente cero), siendo los experimentos rx.6 y rx.7 los más estables. El experimento rx.5, réplica de rx.4 y experimento con más concentración de proteína total en la reacción dentro de esta serie de ensayos, mostró a partir de los 6 minutos una ligera disminución de la recuperación de UA, aunque siguió manteniéndose dentro del intervalo lineal de recuperación. A medida que se diluyó más la cantidad de proteína total en la reacción (ensayos rx.8 y rx.9) existe más variabilidad en la recuperación de UA, aunque de igual manera que en el ensayo rx.5, siguen estando dentro del intervalo lineal de recuperación.

Observándose la formación de dU a lo largo del tiempo de reacción (Imagen 35), se aprecia como los ensayos rx.6, rx.7 y rx.8 mostraron una tendencia lineal superior en los 10 minutos totales de reacción que los ensayos extremos en concentración de proteína total rx.5 y rx.9.

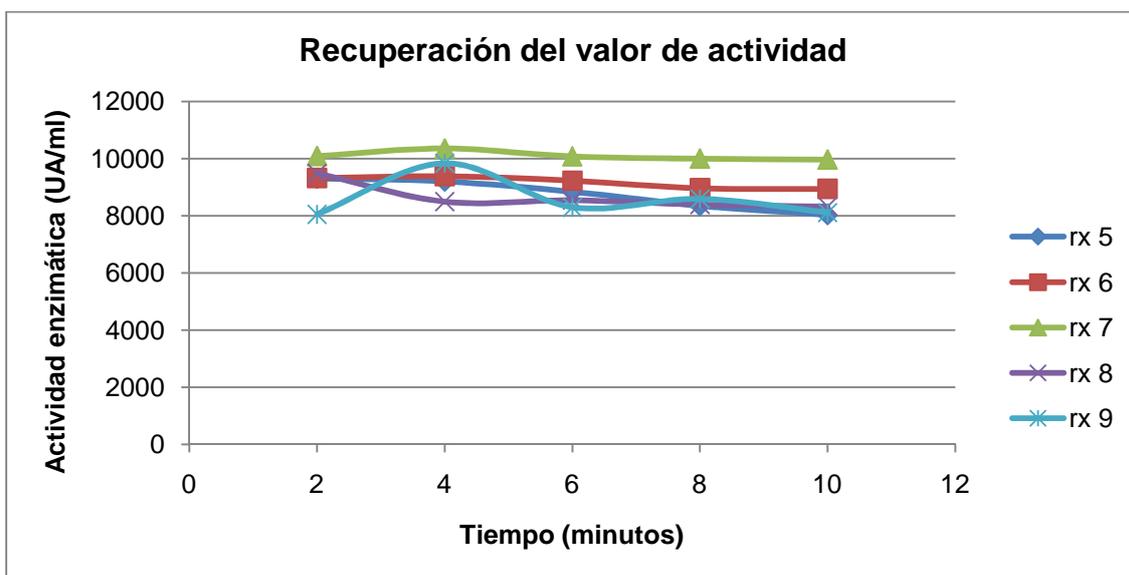


Imagen 34. Representación de la actividad a lo largo del tiempo cuando la concentración de proteína total en la reacción fue de 0,5 µg/ml (rx.5), de 0,2 µg/ml (rx.6), de 0,1 µg/ml (rx.7), de 0,05 µg/ml (rx.8) o de 0,02 µg/ml (rx.9)

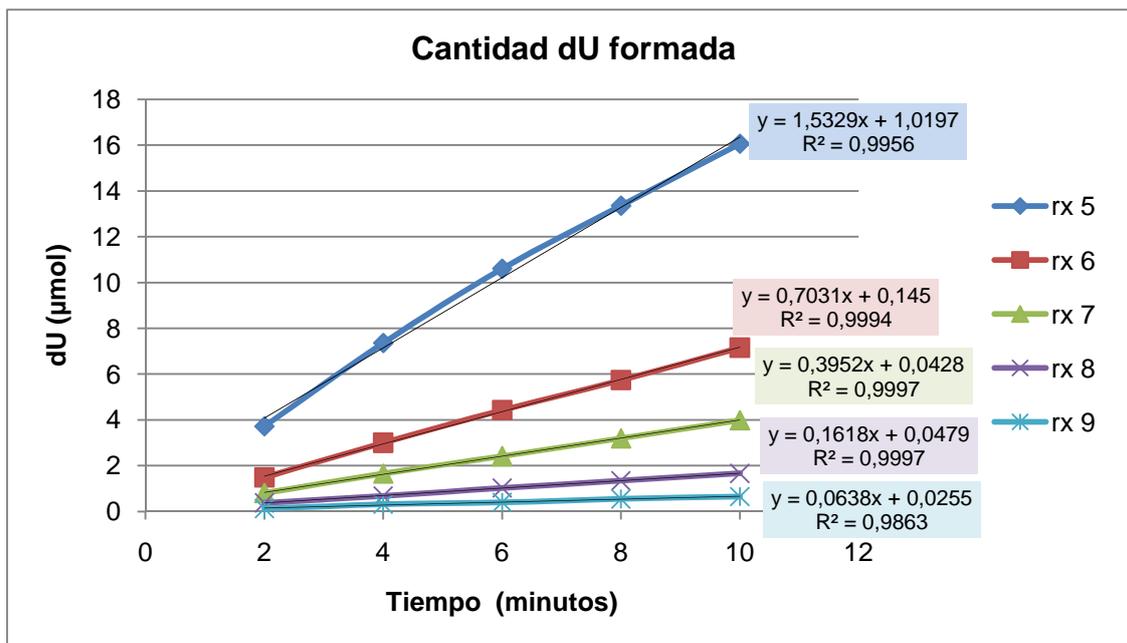


Imagen 35. Representación de la formación de dU a lo largo del tiempo cuando la concentración de proteína total en la reacción fue de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (rx.5), de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (rx.6), de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (rx.7), de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (rx.8) o de 0,02 $\mu\text{g/ml}$ (rx.9)

Tras esta cinética enzimática, se determinó que las mejores condiciones para determinar la actividad enzimática del enzima EcoCDA eran las siguientes:

- Concentración de sustrato dC: 9 mM dC
- Concentración de proteína total: 0,1 $\mu\text{g/ml}$
- Medio de reacción: tampón fosfato 100 mM a pH 7
- Temperatura de reacción = 37 °C
- Agitación = No
- Tiempo de reacción = 5 minutos
- Detención de la reacción: adición de 2,4 volúmenes de metanol

En estas condiciones, el resultado de actividad medida a un punto sería robusto en un rango de concentración de proteína total entre 0,2 y 0,05 $\mu\text{g/ml}$ en la reacción.

A pesar de lo expuesto en cuanto a la robustez del método enzimático, los cálculos se basaban en áreas de unas 500 mAu*s, lo que correspondía a unas 25 ppm en las muestras inyectadas en el HPLC. Por ello se decidió, en este momento, seguir avanzando en la optimización del método pensando entonces, no sólo en la robustez de la reacción enzimática, sino también en que los resultados analíticos fueran fiables. La concentración de 25 ppm de dU está dentro del

rango de linealidad de la cuantificación del HPLC, sin embargo se pretendió realizar una segunda ronda de optimización para evaluar si se podía mantener la robustez del método consiguiendo simultáneamente áreas mayores en los cromatogramas del producto de interés a cuantificar.

7.7. Exploración cinética enzimática (IV)¹¹

Se decidió realizar cinco experimentos adicionales, dos de ellos por duplicado, donde se reproducían las mejores condiciones hasta el momento, pero duplicando la concentración de enzima y duplicando y quintuplicando la concentración de sustrato, y usando una alícuota de enzima que ya había sido descongelada anteriormente una vez (ver Tabla 28).

Así, los experimentos propuestos se realizaron en tampón fosfato 100 mM a pH 7 y a 37°C sin agitación variando la concentración de sustrato y la de proteína total, así como la alícuota usada del extracto enzimático EcoCDA_150417:

Tabla 28. Parámetros de reacción de los ensayos rx.26 a rx.33

Nº rx	[sustrato] (mM)	[prot.total] (µg/ml)	Monitorización (min)	Observaciones
26	9	0,1	5, 10, 15	-----
27	9	0,1	5, 10, 15	-----
28	9	0,2	5, 10, 15	-----
29	9	0,2	5, 10, 15	-----
30	9	0,1	5, 10, 15	Enzima cong./descong.
31	9	0,2	5, 10, 15	Enzima cong./descong.
32	18	0,2	2,4,6,8,10,15	-----
33	45	0,2	2,4,6,8,10,15	-----

Estas reacciones se monitorizaron en los tiempos indicados en la tabla anterior. Se tomó una alícuota de 100 µl de la mezcla de reacción, que se detuvo en 240 µl de MeOH. Se tomaron 200 µl de la mezcla metanólica y se diluyeron en 200 µl de agua calidad HPLC (dilución ½), se

¹¹ Las reacciones rx 10 a rx 25 que no se muestran aquí corresponden al estudio de la actividad enzimática en presencia de cosolventes (ver apartado 12.5.1).

filtraron por filtros de 10 KDa mediante centrifugación, siendo el filtrado el que se analizó por HPLC según el método optimizado y descrito.

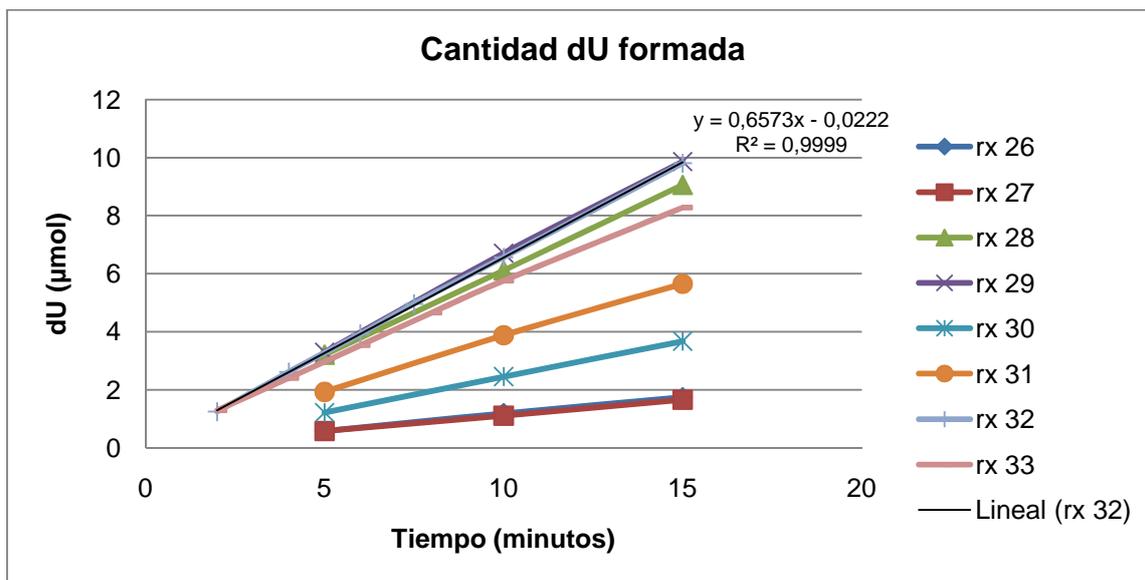


Imagen 36. Representación de la formación de dU a lo largo del tiempo en los experimentos rx.26 a rx.33

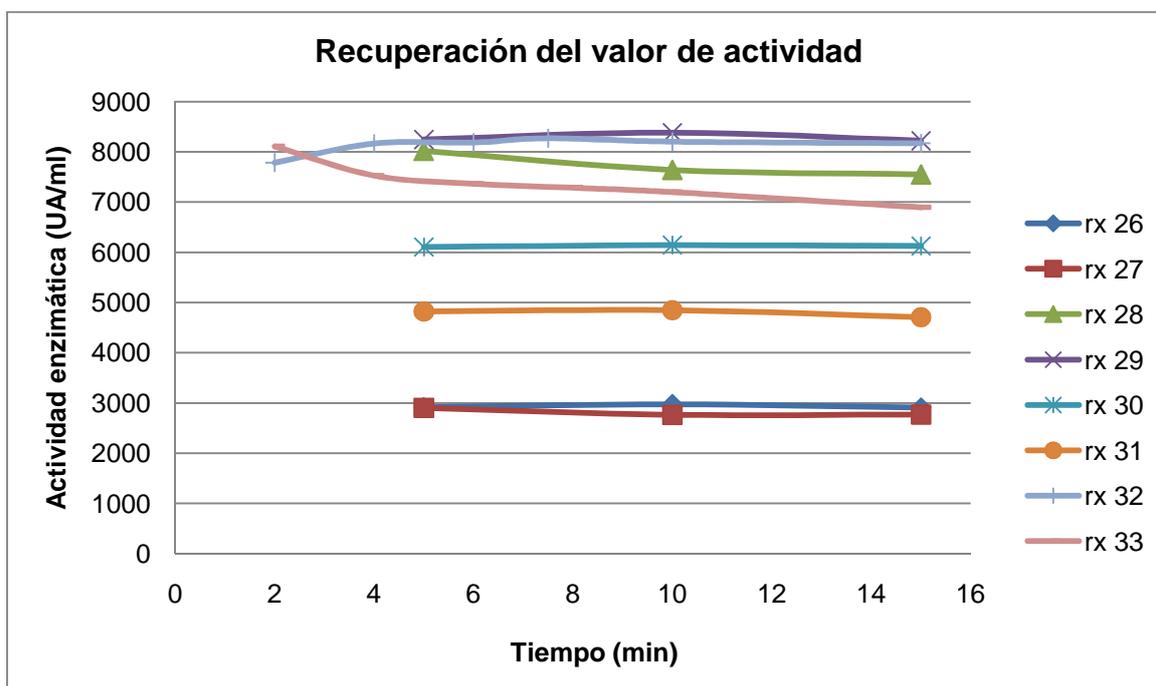


Imagen 37. Representación de la actividad a lo largo del tiempo en los ensayos rx.26 a rx.33

Los experimentos rx.26 y rx.27 eran las reacciones de referencia de las mejores condiciones obtenidas (ver rx.7) en este caso, pero, no se reprodujeron los resultados obtenidos anteriormente, siendo los valores de actividad recuperados tres veces inferiores. Los

resultados de los demás experimentos no se pudieron comparar con estos de referencia aunque sí se pudieron detectar unas tendencias:

- Doblar la cantidad de enzima (rx.28 y rx.29) y también la de sustrato (rx.32) no parecía alterar la actividad comparando con los resultados de la Imagen 34. Además se obtenían áreas mayores para el producto final en los cromatogramas. Pero en el aumento de 5 veces la concentración de sustrato (rx.33), se observó que la recuperación de las UA no fue constante y disminuía con el tiempo, indicativo de la saturación de la reacción.
- El enzima congelado y descongelado (rx.30 y rx.31) parecía haber perdido cierta actividad pero no se pudo calcular la pérdida de actividad precisa porque los valores de referencia no eran fiables.

Para la confirmación de dichas tendencias, se decidió repetir los ensayos de referencia así como los de la alícuota de enzima congelada y descongelada.

7.8. Exploración cinética enzimática (V)

En vista de los resultados obtenidos en la cinética enzimática IV, se decidió repetir parte de los experimentos realizados y descritos en el apartado anterior para confirmar las tendencias atribuidas a los ensayos realizados.

Los experimentos se realizaron en tampón fosfato 100 mM a pH 7 y a 37°C sin agitación variando la concentración de sustrato y la de proteína total, así como la alícuota usada del enzimático EcoCDA_150417:

Tabla 29. Parámetros de reacción para los ensayos rx.34 a rx.45

Nº rx	[sustrato] (mM)	[prot.total] (µg/ml)	Monitorización (min)	Observaciones
34	9	0,1	5	-----
35	9	0,1	5	-----
40	9	0,1	5	-----
41	9	0,1	5	-----
42	9	0,1	5	Enzima cong./descong.
43	9	0,1	5	Enzima cong./descong.
44	18	0,2	5,10,15,20,30	-----
45	18	0,4	5,10,15,20,30	-----

Tabla 30. Resultados de actividad enzimática obtenidos a los 5 minutos en los ensayos de rx.34 a rx.45

Ensayo	Actividad enzimática (UA/ml)
34	10955,6
35	10969,9
40	9939,6
41	9615,0
42	8375,6
43	8372,2
44	9953,9
45	8266,2

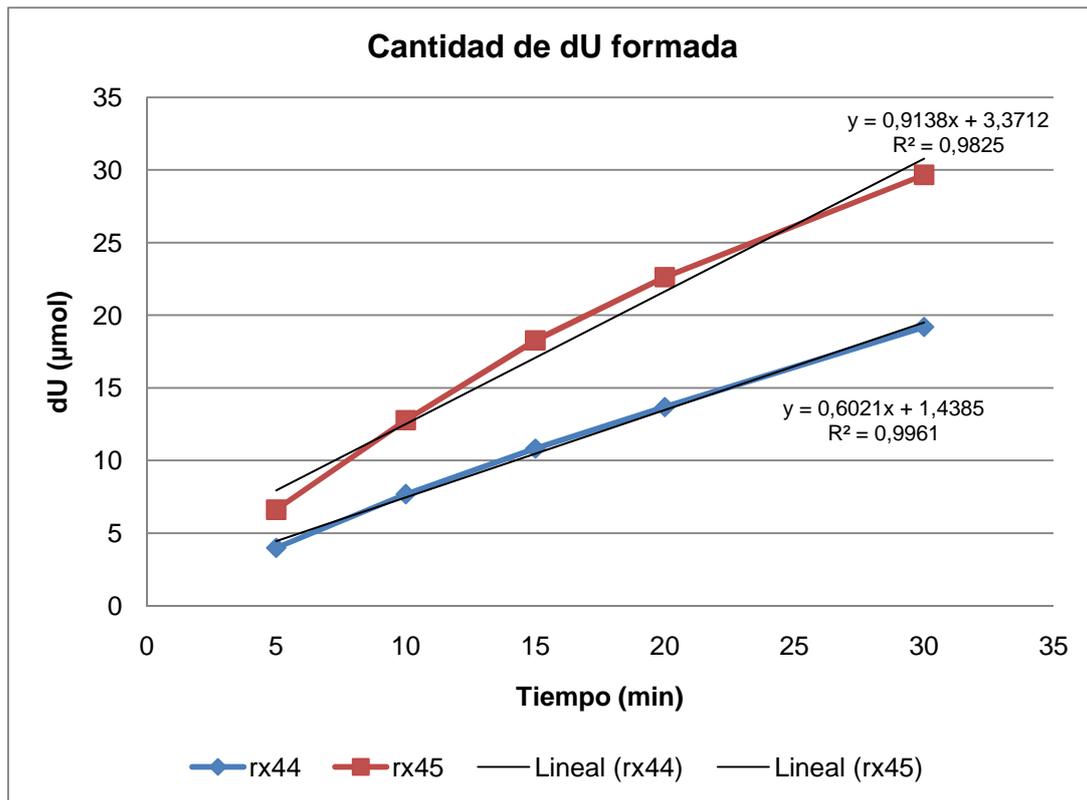


Imagen 38. Representación de la formación de dU a lo largo del tiempo en los ensayos rx.44 (18 mM dC y 0,2 μg/ml) y rx.45 (18 mM y 0,4 μg/ml)

Los resultados obtenidos en las condiciones estándar (rx.34 y rx.35) fueron muy similares a los obtenidos anteriormente (ensayo rx.7) concluyendo que los resultados de los ensayos rx.26 y rx.27 habían sido anómalos. También se observó que la solución diluida del enzima se podía conservar en hielo durante una hora sin afectar a su actividad enzimática (rx.40 y rx.41).

El uso de una alícuota de extracto enzimático que había sido previamente descongelada una vez, mostró una ligera disminución de su actividad, pero los datos indicaron que el extracto soporta un ciclo de congelación-descongelación sin alterar significativamente su actividad enzimática.

La Imagen 38 indica que hasta los 30 minutos, la formación de dU fue lineal para el experimento rx.44 donde se partía de 18 mM de sustrato y 0,2 μg/ml de proteína total, recuperando así, el mismo valor de unidades durante ese tiempo y obteniendo valores de área razonables del producto final dentro del intervalo lineal. Estos datos fueron reproducibles a los obtenidos en el ensayo rx.32 descrito en el apartado anterior. En cambio, cuando se partió de 0,4 μg/ml de proteína total, en 30 minutos no se obtuvo una recta lineal, sino una curvatura de ésta, indicando la saturación de la reacción enzimática.

7.9. Exploración cinética enzimática (VI)

A tenor de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se pretendió averiguar el comportamiento de la reacción manteniendo la concentración de sustrato a 18 mM en una ventana experimental del doble y la mitad de la concentración de proteína de 0,2 µg/ml, y en 2 y 15 minutos de reacción. Al mismo tiempo se evaluó la reproducibilidad a sólo un punto así como la respuesta a extractos enzimáticos que habían sufrido un ciclo de congelación-descongelación¹².

Tabla 31. Parámetros de reacción para los ensayos rx.46 a rx.52

Nº rx	[sustrato] (mM)	[prot.total] (µg/ml)	Monitorización (min)	Observaciones
46	18	0,4	2,5/5/7,5/10/12,5/15	-----
47	18	0,2	2,5/5/7,5/10/12,5/15	-----
48	18	0,1	2,5/5/7,5/10/12,5/15	-----
49	18	0,2	10	-----
50	18	0,2	10	-----
51	18	0,2	10	Enzima cong./descong.
52	18	0,2	10	Enzima cong./descong.

Los experimentos indicados en la tabla anterior se realizaron en tampón fosfato 100 mM a pH 7 y a 37°C sin agitación, manteniendo la concentración de sustrato a 18 mM y la de proteína total en un rango de 0,1 y 0,4 µg/ml, así como la alícuota usada del enzimático EcoCDA_150417. Las muestras se detuvieron con 2,4 volúmenes de metanol y posteriormente se diluyeron ½ con agua para ser filtradas por 10 KDa por centrifugación previo a su análisis por HPLC.

¹² Se determinó de nuevo la actividad enzimática de estas muestras ya que las condiciones enzimáticas (concentración de sustrato y proteína total) habían sido modificadas respecto las anteriores determinaciones de este tipo de muestras.

Tabla 32. Resultados de actividad enzimática obtenidos a los 10 minutos en los ensayos rx.46 a rx.52

Ensayo	Actividad enzimática (UA/ml)
46	12658,57
47	6664,31
48	6142,54
49	5573,42
50	5422,22
51	6044,94
52	6584,43

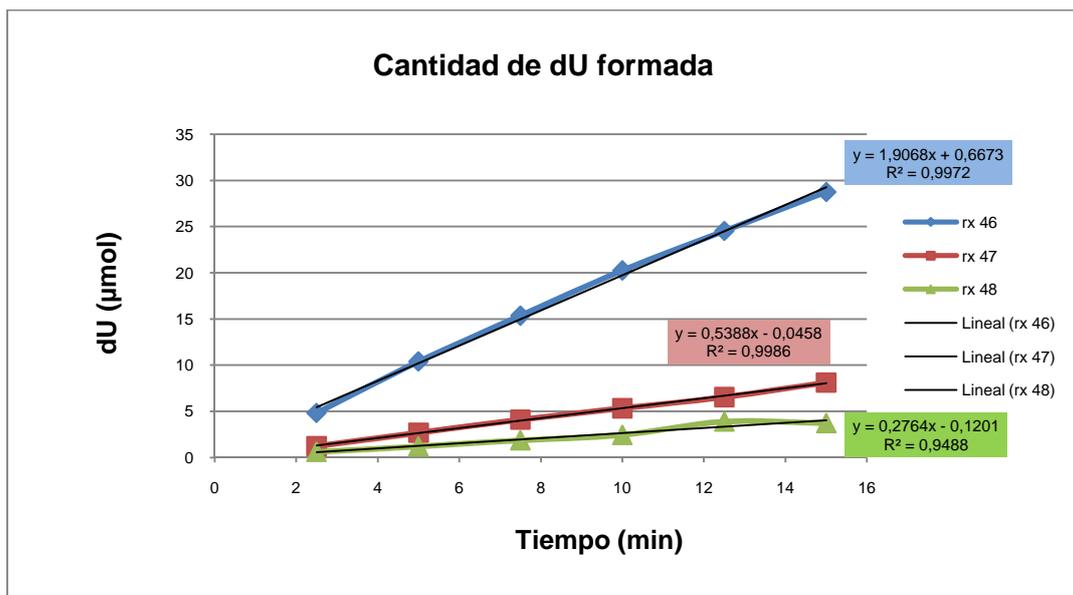


Imagen 39. Representación de la formación de dU a lo largo del tiempo en los ensayos rx.46 (0,4 µg/ml), rx.47 (0,2 µg/ml) y rx.48 (0,1 µg/ml)

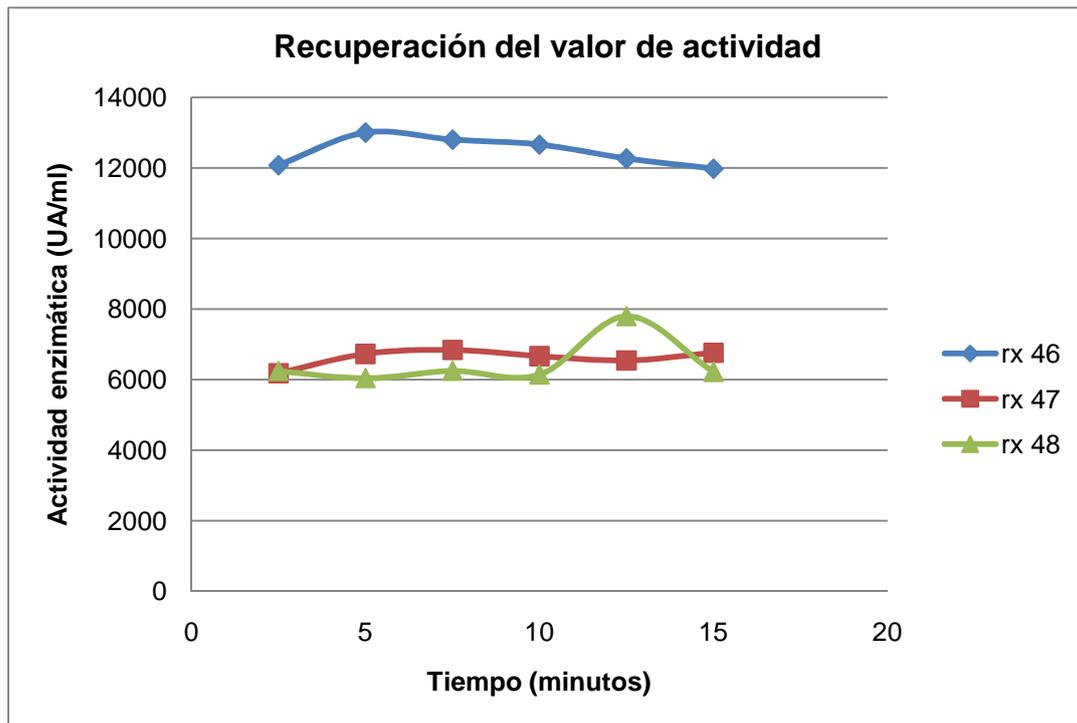


Imagen 40. Representación de la actividad a lo largo del tiempo en los ensayos rx.46, rx.47 y rx.48

A la vista de los resultados se pudo concluir que un ciclo de descongelación/congelación no degrada al catalizador, ya que las UA recuperadas en las rx.51 y rx.52 no fueron menores (de hecho fueron numéricamente mayores) que las reacciones de referencia (rx.49 y rx.50).

Sin embargo, la reacción rx.46 devuelve el doble de UA que las rx.47 y rx.48. Esta diferencia podía atribuirse a un error experimental, pero el hecho es que se comprobó que existía bastante variabilidad entre los resultados, no sólo de esta serie experimental, sino también respecto a los de ensayos anteriores que deberían ser comparables; las rx.49 y rx.50 devolvían resultados menores que las rx.32, rx.44 y rx.47, de las que son réplicas.

Parece que había algún factor no controlado que provocaba una variabilidad excesiva entre ensayos¹³.

A pesar de ello, se empezaron a definir unas condiciones de reacción que podrían ser adecuadas para establecer la reacción tipo para el ensayo de actividad. Una variable que se pretendió estudiar es el comportamiento del enzima, esto es, cambiar del lote que se había usado hasta el momento (EcoCDA_150417), que es un lote producido por fermentación en

¹³ Posteriormente, con el uso de un nuevo lote de enzima procedente de fermentación en biorreactor, esta variabilidad quedó muy minimizada. Por tanto, pudo atribuirse a la insuficiente homogeneidad de la muestra de enzima utilizada en la primera parte del estudio.

erlenmeyer, a un lote producido por fermentación en biorreactor el cual, aún sin optimizar, debería ser representativo del tipo de catalizador que se debería producir en el futuro. Por todo ello se decidió acabar de ajustar la optimización del método con el nuevo lote (05-USP12-P01) para ver si era más homogéneo en los resultados y para comprobar también, si el método era adecuado.

7.10. Exploración cinética enzimática (VII)¹⁴

Con objetivo de comprobar si las condiciones exploradas hasta el momento servían para evaluar los lotes producidos en el biorreactor se realizaron seis nuevas cinéticas que correspondían a duplicados de tres condiciones, todas ellas realizadas con el nuevo lote de catalizador (05-USP12-P01) que contenía 10 mg de proteína total / ml de extracto.

Tabla 33. Parámetros de reacción para los ensayos rx.82 a rx.87.

Nº rx	[sustrato] (mM)	[prot.total] (µg/ml)	Monitorización (min)	Observaciones
82	18	0,4	10, 15, 20	-----
83	18	0,4	10, 15, 20	-----
84	18	0,2	10, 15, 20	-----
85	18	0,2	10, 15, 20	-----
86	18	0,1	10, 15, 20	-----
87	18	0,1	10, 15, 20	-----

La monitorización se realizó como se describe anteriormente, deteniendo 100 µl de la reacción con 240 µl de metanol y diluyendo ½ con agua para filtrar. Los resultados obtenidos de estas reacciones se representan en las siguientes gráficas.

¹⁴ En las reacciones rx 53 a rx 60 se detectó una pérdida de actividad enzimática sin una causa clara. Desde la rx 61 a la rx 81 se realizaron repeticiones hasta la identificación de la causa de la pérdida de actividad, siendo esta el lote de KH₂PO₄ usado para la preparación del tampón.

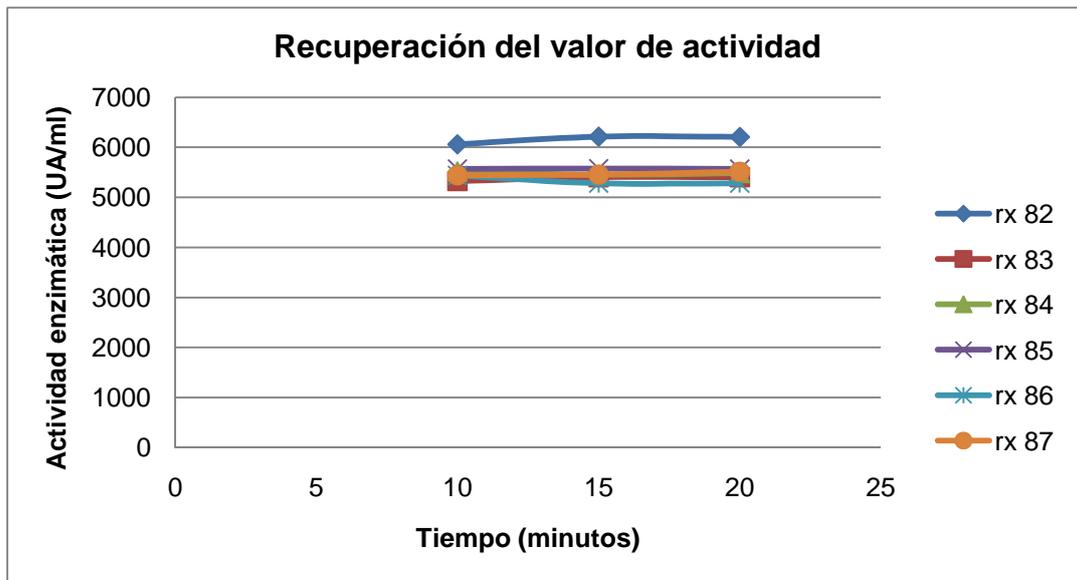


Imagen 41. . Representación de la actividad a lo largo del tiempo en los ensayos rx.82 y rx.83 (0,4 µg/ml), rx.84 y rx.85 (0,2 µg/ml), rx.86 y rx.87 (0,1 µg/ml)

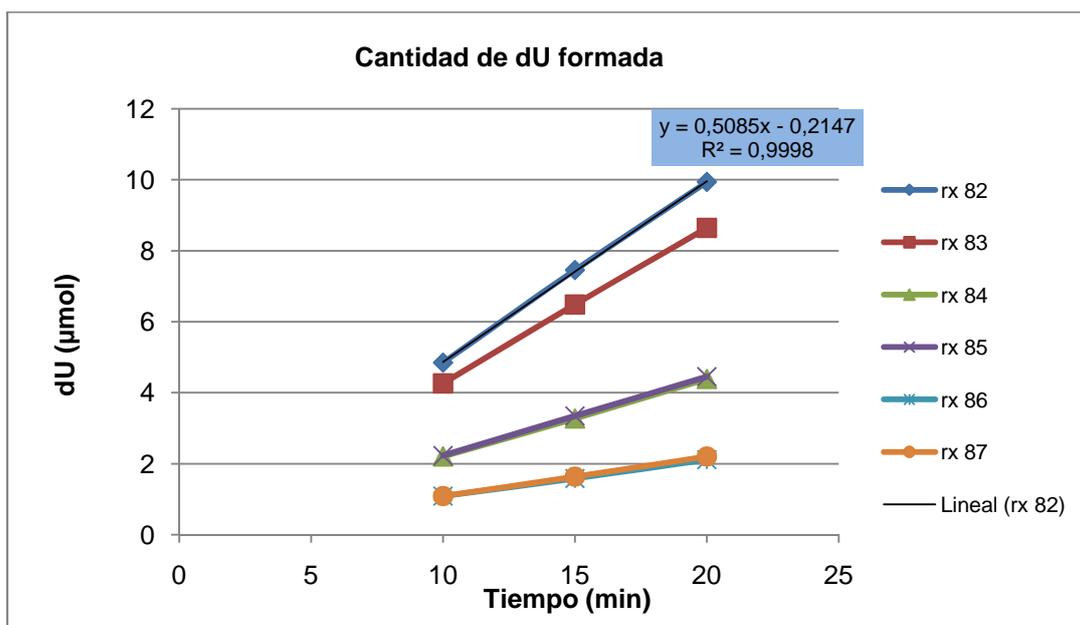


Imagen 42. Representación de la formación de dU a lo largo del tiempo en los ensayos rx.82 y rx.83 (0,4 µg/ml), rx.84 y rx.85 (0,2 µg/ml), rx.86 y rx.87 (0,1 µg/ml)

Se aprecia claramente que las unidades recuperadas en todos los casos (en todas las series y para todos los tiempos) son muy similares, detectándose sólo una serie por encima del resto, la rx.82 que corresponde con una de las réplicas que contenían mayor concentración de proteína total. Para comprobar si esta deriva entre las réplicas podía deberse, precisamente, a una tendencia presente en las reacciones con mayor cantidad de proteína, se programaron

nuevos experimentos a mayores concentraciones de enzima. Salvo por esta discrepancia en una serie respecto a las otras, el resto de características de las cinéticas fueron satisfactorias, en ninguna cinética se apreció saturación hasta los 20 minutos ensayados y la recuperación de las unidades pareció independiente del tiempo y de la dilución enzimática.

7.11. Exploración cinética enzimática (VIII)

Según lo expuesto en el apartado anterior, se realizaron ocho nuevas reacciones con el mismo enzima para poder evaluar si, por un lado, se detectaba una tendencia en la disparidad de resultados a mayores concentraciones de enzima presente en la reacción y si, por otro lado, se podían aumentar las áreas de producto dU detectadas en los cromatogramas (en estas reacciones rondaban las 2500 mAu*s en las reacciones de mayor contenido enzimático a los 15 minutos), lo que conseguiría acercar las áreas a la zona central de la linealidad de cuantificación, bien aumentando el tiempo de reacción, bien la cantidad de enzima, bien combinando ambos factores.

Las reacciones realizadas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 34. Parámetros de reacción para los ensayos rx.88 a rx.95

Nº rx	[sustrato] (mM)	[prot.total] (µg/ml)	Monitorización (min)	Observaciones
88	18	0,4	5, 10, 15, 20	-----
89	18	0,4	5, 10, 15, 20	-----
90	18	0,8	5, 10, 15, 20	-----
91	18	0,8	5, 10, 15, 20	-----
92	18	1,6	5, 10, 15, 20	-----
93	18	1,6	5, 10, 15, 20	-----
94	18	2,5	5, 10, 15, 20	-----
95	18	2,5	5, 10, 15, 20	-----

La toma de controles se realizó como se ha descrito anteriormente. Los resultados graficados obtenidos se muestran en las siguientes gráficas.

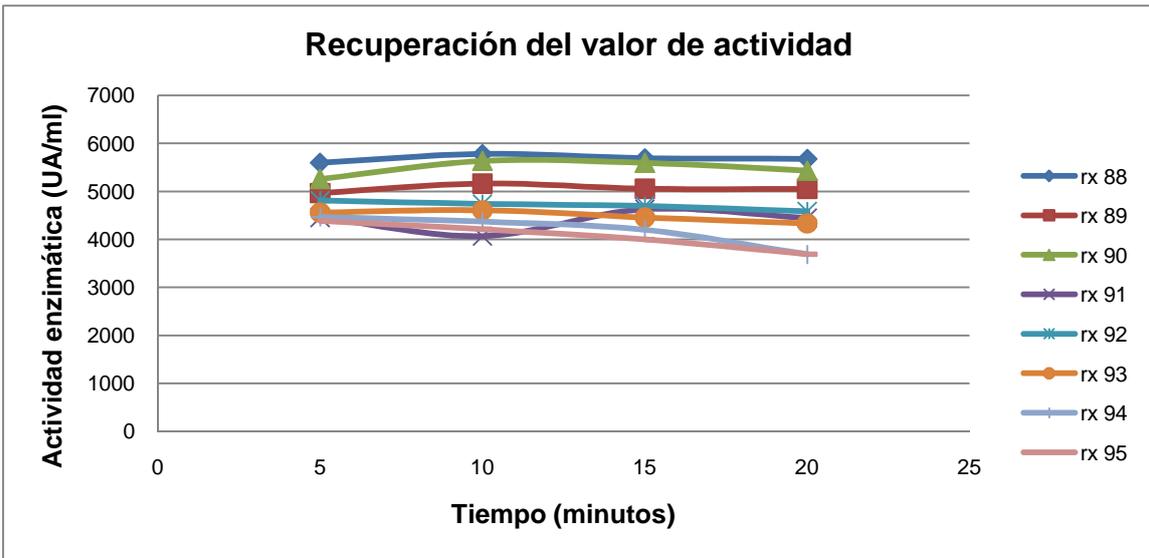


Imagen 43. Representación de la actividad a lo largo del tiempo en los ensayos rx.88 y rx.89 (0,4 $\mu\text{g/ml}$), rx.90 y rx.91 (0,8 $\mu\text{g/ml}$), rx.92 y rx.93 (1,6 $\mu\text{g/ml}$), rx.94 y rx.95 (2,5 $\mu\text{g/ml}$)

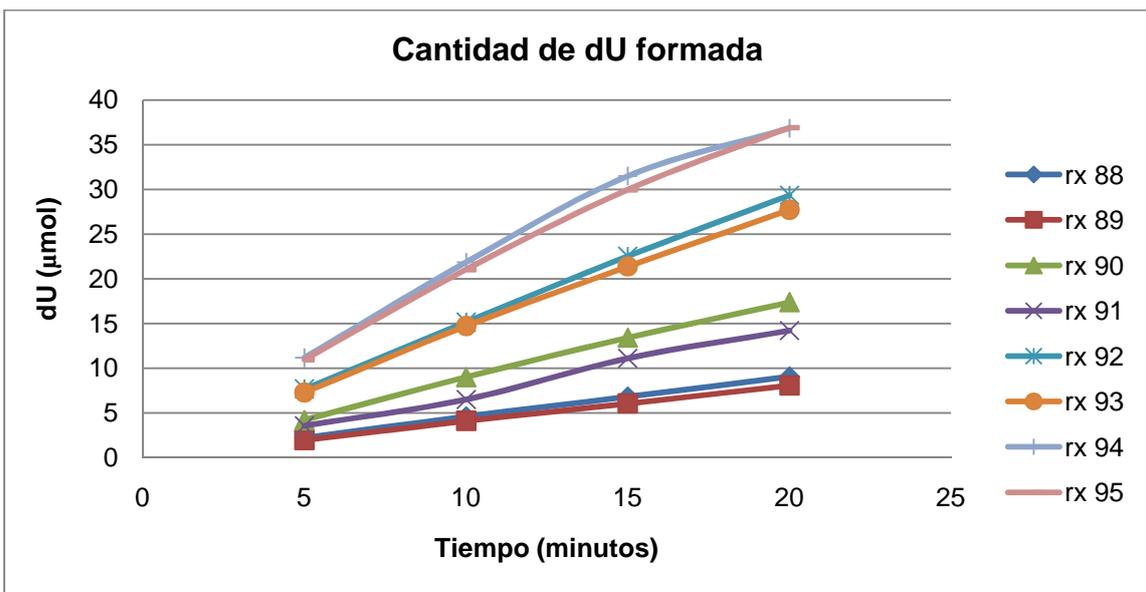


Imagen 44. Representación de los μmoles formados de dU a lo largo del tiempo en los ensayos rx.88 y rx.89 (0,4 $\mu\text{g/ml}$), rx.90 y rx.91 (0,8 $\mu\text{g/ml}$), rx.92 y rx.93 (1,6 $\mu\text{g/ml}$), rx.94 y rx.95 (2,5 $\mu\text{g/ml}$)

En este caso, también se apreció cierta variabilidad en el global de los resultados pero no fue atribuible a ninguna tendencia relacionada con el aumento de la concentración enzimática presente en la reacción.

Sí se apreció cierto grado de saturación en el control de 20 minutos para las reacciones rx.94 y rx.95, que eran las que contenían mayor cantidad de enzima, que corresponde con un descenso en las UA recuperadas en estas dos reacciones a partir del control de los 15 minutos,

por lo que no se recomendaría un control a tiempos tan largos con esta concentración enzimática. Sin embargo, hasta esta saturación, se apreció de nuevo que todas las reacciones devolvían valores similares de UA, lo que reforzó la robustez del método.

Para escoger las condiciones que se iban a definir como condiciones de ensayo se tuvo en cuenta la posibilidad de variación de los lotes a analizar, por lo que se pretendía establecer unas condiciones que pudieran resistir variaciones importantes en los valores de actividad sin mermar la confianza en el valor devuelto por el método. Por ello, no se iban a indicar como condiciones de ensayo aquellas que estuvieran cerca del límite de saturación sino que, en su lugar, se iban a marcar como condiciones estándar aquellas que se situaran en una zona más central del espacio experimental para que si un nuevo lote de catalizador presentara doble de actividad / mg de proteína o triple de actividad pueda igualmente ser analizado sin saturación del método. Por todo lo expuesto, las condiciones de 0,4 µg de proteína / ml parecían adecuadas ya que presentaban margen de maniobra tanto por el límite superior como por el inferior, y el tiempo que se escogió es de 15 minutos ya que, en estas condiciones, las áreas de nuevo estaban por encima de 2000 mAu*s.

Aún así, para intentar aumentar algo más las áreas del producto a detectar, y para también establecer un valor de proteína total que facilitara en el futuro las diluciones a realizar del catalizador, se propuso una corrección para pasar de 0,4 a 0,5 µg de proteína total / ml. Este valor se consideró adecuado y centrado en el espacio experimental explorado, pero es un valor que, en sí mismo, no se había probado hasta el momento, así que se programó una nueva cinética con estos valores coincidiendo con el estudio de reproducibilidad de las condiciones de reacción.

7.12. Reproducibilidad del método, cinética enzimática (IX)

Como se ha comentado en el apartado anterior, se pretendió evaluar la reproducibilidad del método a la vez que comprobar que las condiciones de reacción propuestas encajaban con los valores obtenidos hasta el momento. Por ello se realizaron las siguientes reacciones, ejecutadas por dos analistas diferentes.

Tabla 35. Parámetros de reacción para los ensayos rx.96 a rx.109

Nº rx	[sustrato] (mM)	[prot.total] (µg/ml)	Monitorización (min)	Observaciones
96	18	0,5	15	Analista 1
97	18	0,5	15	Analista 1
98	18	0,5	15	Analista 1
99	18	0,5	15	Analista 1
100	18	0,5	15	Analista 1
101	18	0,5	15	Analista 1
102	18	0,5	5, 10, 15, 20, 25, 30	Analista 1
103	18	0,5	15	Analista 2
104	18	0,5	15	Analista 2
105	18	0,5	15	Analista 2
106	18	0,5	15	Analista 2
107	18	0,5	15	Analista 2
108	18	0,5	15	Analista 2
109	18	0,5	5, 10, 15, 20, 25, 30	Analista 2

El muestreo de las reacciones se realizó de igual manera a lo descrito en los apartados anteriores. El resumen de los resultados se presenta en las siguientes gráficas.

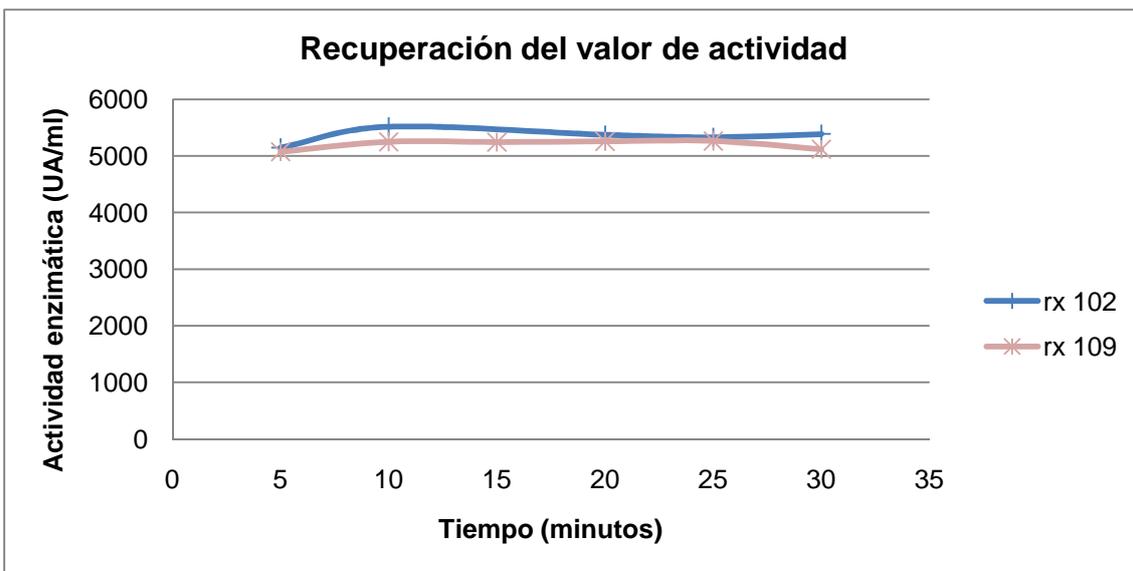


Imagen 45. Representación de la actividad a lo largo del tiempo en los ensayos rx.102 y rx.109

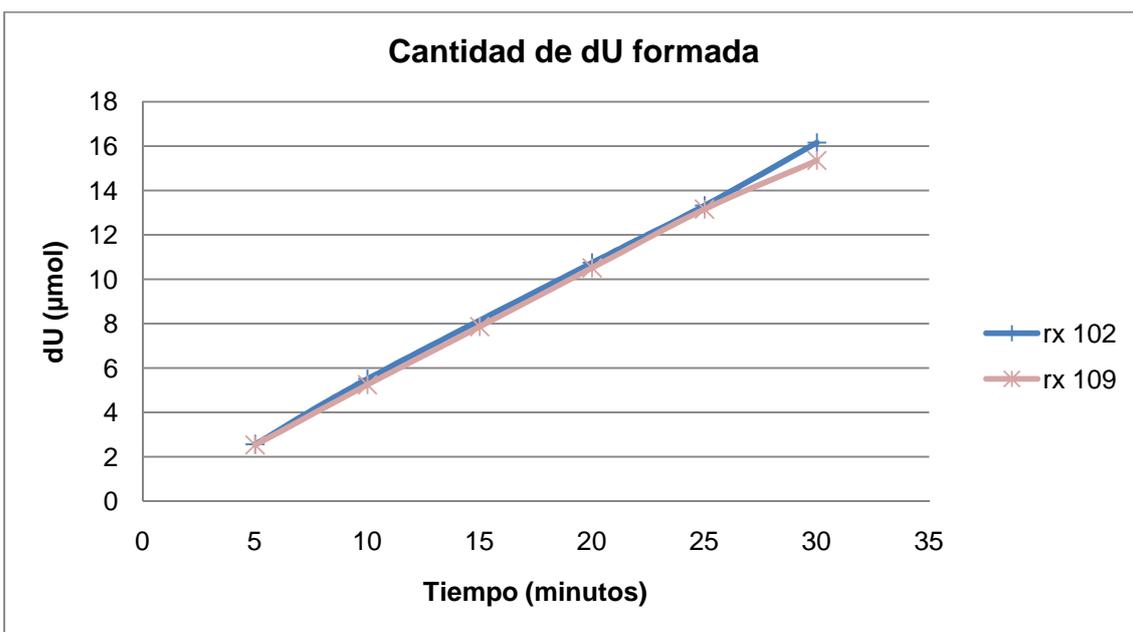


Imagen 46. Representación de los µmoles formados de dU a lo largo del tiempo en los ensayos rx.102 y rx.109

En la representación de los resultados se ha eliminado el punto de los 15 minutos de la rx.102 por considerarse un error experimental, ya que estaba claramente alejado de la tendencia lineal.

Las cinéticas de la reacción que se obtuvieron en las nuevas condiciones descritas eran claramente lineales y no presentaron saturación de la reacción. Salvo el valor descartado, las dos réplicas realizadas presentaron valores muy similares en todos los puntos, lo que confirmó que estas condiciones eran coherentes con las condiciones exploradas tanto por encima como por debajo del punto nominal.

En cuanto a los doce replicados ejecutados para determinar la variabilidad del método, se obtuvo un CV global de un 8,2%, lo que se interpreta como un muy buen CV para un ensayo enzimático (ver Tabla 36).

Respecto a las áreas de producto obtenidas a los 15 minutos, todas rondaron las 3000 mAu*s, lo que corresponde a unas 140-150 ppm según la recta de cuantificación del método.

Tabla 36. Resultados de actividad, precisión y reproducibilidad (ensayos rx.96 a rx.101, y rx.103 a rx.108)

Analista	Ensayo	Actividad enzimática (UA/ml)	Parámetros estadísticos
1	rx.96	5949,4	Media 6073,3 Desv.est. 606,4 CV(%) 9,98
	rx.97	5483,2	
	rx.98	6069,4	
	rx.99	6564,8	
	rx.100	5409,3	
	rx.101	6963,5	
2	rx.103	6262,9	Media 5748,9 Desv.est. 295,0 CV(%) 5,13
	rx.104	5666,4	
	rx.105	5431,7	
	rx.106	5794,1	
	rx.107	5825,0	
	rx.108	5513,3	
Parámetros estadísticos	Media	5911,1	
	Desv.est.	485,2	
	CV(%)	8,21	

Por todo ello se consideró que las condiciones desarrolladas cumplían los requerimientos para el método enzimático y se dio por terminada la optimización, definiéndose el método analítico para la evaluación de rutina de los nuevos lotes de catalizador EcoCDA..

8. Optimización de la reacción biocatalítica

8.1. Descripción de la cinética de la reacción

8.1.1. Reproducibilidad de los resultados de la PoC

Los resultados obtenidos en los ensayos de reproducibilidad de la PoC se muestran a continuación:

Tabla 37. Resultados de conversión a 24 h de las diferentes pruebas de concepto.

Experimento	Lote sustrato	Lote Enzima	Conversión a 24 h (%)
PoC-1	RT-245-071	141111_02	86
PoC-2	RT-245-071	141111_02	83
PoC-3	RT-245-071	150417	97
PoC-4	MMG-263-049-02	150417	97

A tenor de estos resultados, se observó que el proceso es reproducible, por lo que se consideró que la PoC era suficientemente consistente como para iniciar su optimización. Estos resultados definieron el punto de partida de esta nueva fase, a partir del nuevo lote de sustrato y de enzima que se utilizaron en ella.

8.1.2. Estudio de solubilidad

Con el objetivo de establecer las máximas concentraciones de trabajo que permitieran solubilizar el sustrato, a las posibles distintas temperaturas en estudio, se realizaron pruebas de solubilidad hasta determinar la concentración de saturación del sustrato en el medio de reacción (intermedio 3.2.) y producto final (sofosbuvir).

Tabla 38. Resultados de solubilidad del intermedio 3.2 y del producto final en el medio de reacción

Compuesto	Solubilidad ¹⁵	
	g/l	mM
Intermedio 3.2	15	28,4
Sofosbuvir	7	13,2

El producto de partida, intermedio 3.2., presentó mayor solubilidad en el medio de reacción que el producto final sofosbuvir. Este dato se consideró relevante y se tuvo en cuenta ya desde el inicio del proceso en vistas al diseño del proceso de work-up.

8.1.3. Estudio del efecto de la concentración de sustrato

El objetivo en este momento fue determinar cómo se comporta la reacción cuando se trabaja a máxima carga de sustrato en disolución, aprovechando la diferente solubilidad de ambos productos en el medio de reacción (ver tabla anterior).

Para ello se realizaron reacciones a máxima solubilidad de sustrato y al 75% de su solubilidad (este segundo valor se introdujo con la finalidad de comprobar si existe inhibición del enzima por sustrato).

Se realizó una batería de cuatro experimentos, todos ellos a 37°C combinando los parámetros:

Tabla 39. Condiciones de las reacciones R9A1 a R9A4 para el estudio de la concentración de sustrato

Experimento	Concentración sustrato (g/l)	Equivalentes Enzima
R9A1	15,15 (100%)	1
R9A2	11,4 (75%)	1
R9A3	15,15 (100%)	2
R9A4	11,4 (75%)	2

¹⁵ Medio: Tampón fosfato 30 mM a pH 7, Tª = 37°C

Tal y como se observa en los siguientes perfiles de reacción, en ninguno de los experimentos se observó inhibición del enzima por sustrato, puesto que el aumento de la concentración rinde mayor conversión a producto final (R9A1 vs R9A3).

Por otra parte, se observa como un aumento en la relación estequiométrica entre sustrato y enzima (R9A3 y R9A4), doblando la cantidad de biocatalizador respecto a los experimentos anteriores, es capaz de transformar hasta un 30% más de producto en los mismos tiempos de reacción, por lo que el aumento de la cantidad de biocatalizador en el medio ejerce un efecto favorable sobre la conversión.

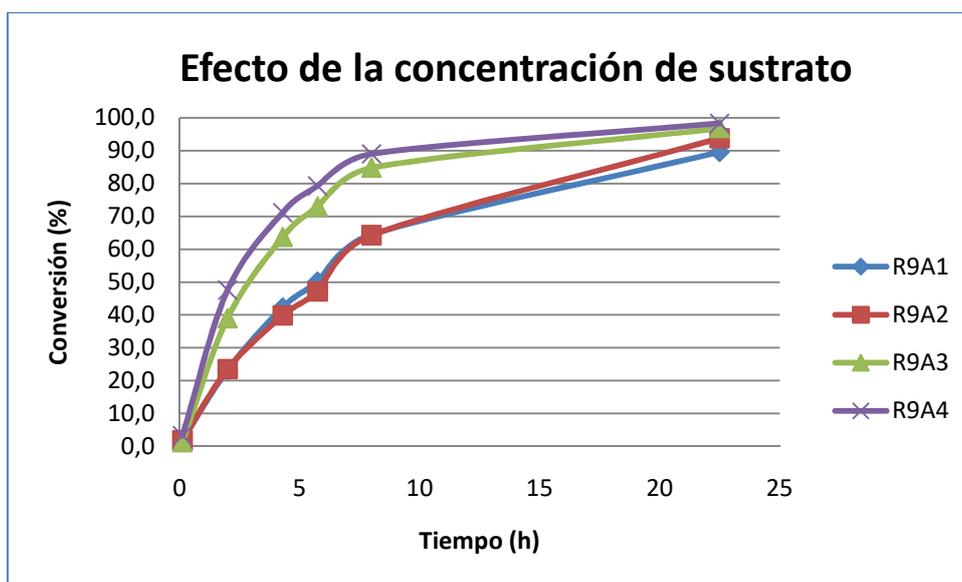


Imagen 47. Estudio del efecto de la concentración de sustrato sobre el perfil cinético de la reacción

8.1.4. Estudio del efecto de la estequiometría enzima/sustrato a 37°C

Partiendo de la estequiometría de referencia estudiada durante la PoC (1 equivalente), se procedió a modificar este parámetro para evaluar cuál es su efecto, principalmente sobre la cinética de la reacción.

Para ello se realizó una batería de seis experimentos, todos ellos a 37°C y saturación de sustrato (15 g/l de producto de partida), combinando los parámetros:

Tabla 40. Condiciones de las reacciones realizadas para el estudio de la estequiometría enzima / sustrato

Experimento	Equivalentes Enzima
R9A1	1
R9A3	2
R9A5	2,5
R9A6	3
R9A13	0,5
R9A14	0,75

Las reacciones se monitorizaron durante un periodo de 24 horas, excepto aquellas con una relación estequiométrica inferior a 1, que se monitorizaron durante 48 horas en previsión que su velocidad de reacción se viera ralentizada por este factor.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

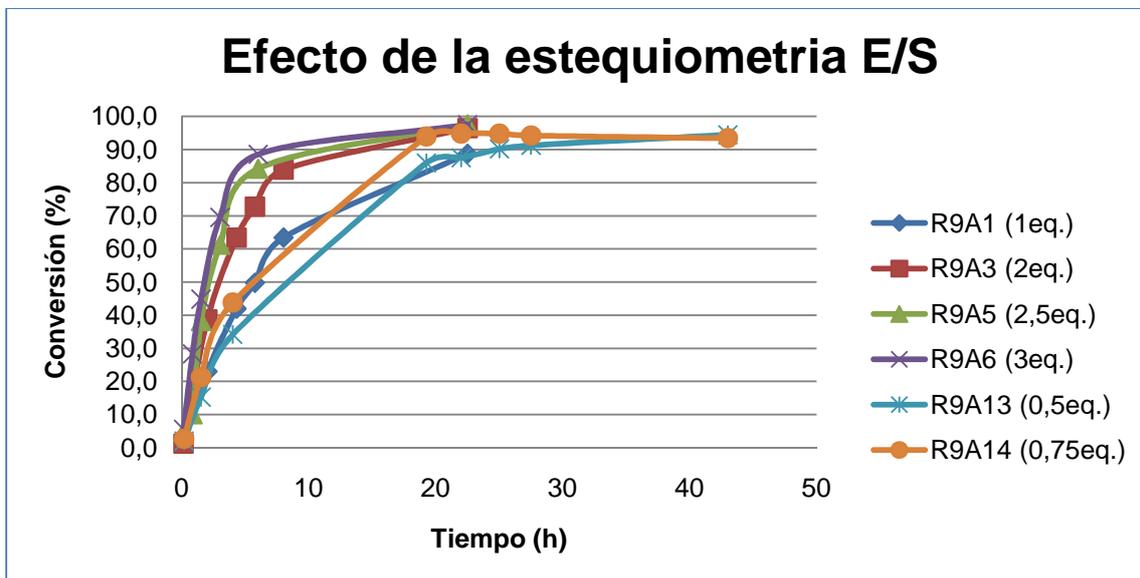


Imagen 48. Estudio del efecto de la estequiometría enzima/sustrato sobre el perfil cinético de la reacción

Tal y como se observa en los perfiles de reacción mostrados, respecto de la reacción control R9A1 donde se utilizó 1 equivalente de enzima, las reacciones R9A13 (0,5 equivalentes) y R9A14 (0,75 equivalentes) son las que presentaron conversiones inferiores a mismos tiempos

Así, se llevó a cabo la reacción con tampón NH_4HCO_3 ¹⁶ 30 mM para comparar los resultados con la referencia de KH_2PO_4 30 mM, tomando las condiciones de referencia a 37°C y máxima solubilidad del sustrato (15 g/l), usando un equivalente de enzima.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

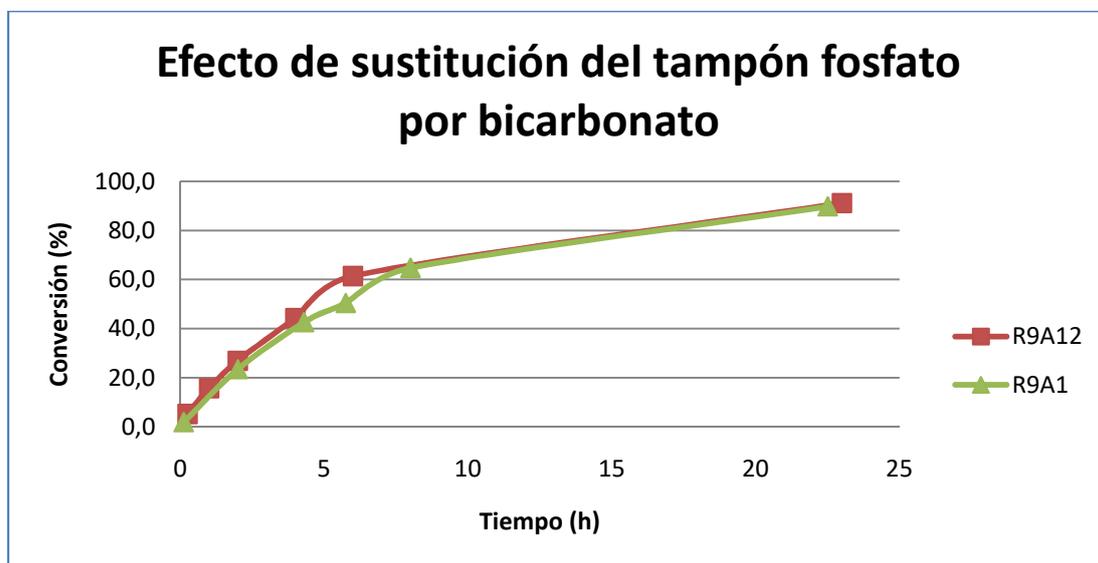


Imagen 49. Estudio del efecto del cambio de tampón: de tampón fosfato (R9A1) a tampón bicarbonato (R9A12)

Tal y como se observa en los perfiles de reacción mostrados, respecto de la reacción control R9A1 donde se utilizó tampón fosfato 30 mM, la reacción R9A12 en tampón bicarbonato 30 mM presenta el mismo comportamiento, no observándose ningún efecto por la modificación de este parámetro.

Esta sustitución permite pasar de un residuo salino de 269 g KH_2PO_4 /kg sofosbuvir a 156 g NH_4HCO_3 /kg sofosbuvir.

Nota:

El pH del medio se monitorizó de manera semicuantitativa, presentando la siguiente evolución:

¹⁶ Se utilizó sal amónica por ser la disponible en el laboratorio en el momento de realización de este experimento

Tabla 41. Evolución del pH durante la evolución de la reacción R9A12

Código Reacción	Control de reacción	Tiempo (h)	pH crudo
R9A12	C1	0,25	7,5
	C2	1	9-9,5
	C3	2	9-9,5
	C4	4	9-9,5
	C5	6	9-9,5
	C6	23	9-9,5

Cabe remarcar que precisamente por el hecho de observar esta variación de pH con el tiempo, y a pesar de utilizar un tampón, en realidad el medio deja de tener capacidad tamponante ya desde el inicio de la reacción¹⁷.

Para la reacción R9A1 no se disponía de la determinación de pH equivalente, aunque es de suponer que quizás presentó una evolución similar. Probablemente por esta razón, la sustitución de una sal por otra no presentó ningún efecto sobre la conversión.

8.2.2. Eliminación del tampón

Adicionalmente, se estudió el efecto de la eliminación del tampón, y por tanto, de sus sales inorgánicas, del medio de reacción. Esta modificación tiene como principal ventaja la enorme reducción de residuos salinos a tratar como resultado de la producción, si bien tiene como principal inconveniente la incapacidad de amortiguar el ascenso de pH del medio debido a la eliminación del co-producto amoníaco a medida que transcurre la reacción.

Tampón $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ pH=7,0

Agua desionizada pH= 7,14

Del mismo modo que en el apartado anterior, previamente se verificó el comportamiento del enzima en estas nuevas condiciones, para asegurar su operabilidad. Así, se realizó la determinación de actividad enzimática sobre la reacción tipo utilizando agua sin tamponar como medio de reacción. De nuevo, el resultado obtenido en este ensayo no presentó diferencias apreciables respecto del comportamiento enzimático en tampón fosfato (datos no

¹⁷ Más allá del propio valor de pH, éste revela que la especie NH_3 liberada al medio está libre y “viva”. Este aspecto se tuvo muy en cuenta durante todo el desarrollo puesto que pudiera tener algún efecto sobre el perfil de impurezas observadas durante la reacción.

mostrados), por lo que se procedió a evaluar su aplicabilidad a la reacción de desaminación del intermedio 3.2.

Así, se llevó a cabo la reacción en agua (R9A11) para comparar los resultados con la referencia de H_2PO_4^- , tomando las condiciones de referencia a 37°C y máxima solubilidad del sustrato (15 g/l), usando un equivalente de enzima (R9A1).

El resultado obtenido se muestra a continuación:

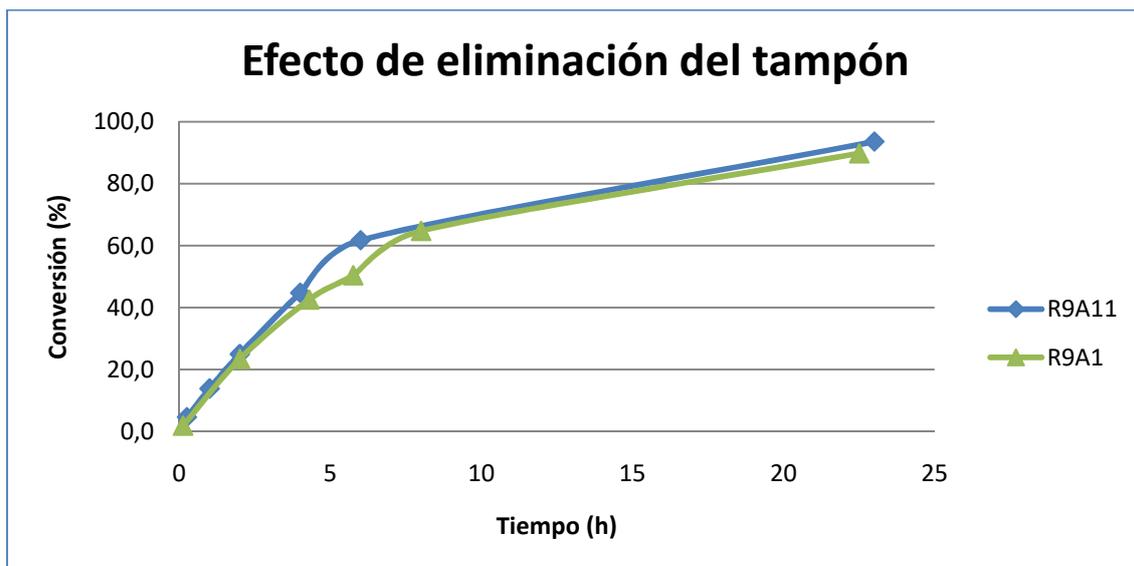


Imagen 50. Estudio del efecto del cambio de tampón: de tampón fosfato (R9A1) a agua desionizada en medio no tamponado (R9A11)

Durante la monitorización de la reacción se controló la variación de pH del medio, pasando de un valor de neutralidad a tiempo cero, hasta un pH=9 a tiempo final de la reacción.

Tal y como se observa en los perfiles de reacción mostrados, respecto de la reacción control R9A1 donde se utilizó tampón fosfato 30 mM, la reacción R9A11 en agua presenta el mismo comportamiento, no observándose ningún efecto en la conversión por la modificación de este parámetro.

Este resultado se consideró de una gran relevancia medioambiental, ya que finalmente se había conseguido pasar de un residuo salino de 269 g KH_2PO_4 /kg sofosbuvir a 0 g tampón/kg sofosbuvir.

A tenor de este resultado, y a pesar de que formaba parte del plan de trabajo inicial, se descartó estudiar el efecto de la disminución de la concentración del tampón en la reacción, puesto que el agua sin tamponar ofreció resultados idénticos a los obtenidos con los medios tamponados con los que se había comparado.

Nota:

El pH del medio se monitorizó de manera semicuantitativa, presentando la siguiente evolución:

Tabla 42. Evolución del pH durante la evolución de la reacción R9A11

Código Reacción	Control de reacción	Tiempo (h)	pH crudo
R9A11	C1	0,25	7
	C2	1	8
	C3	2	9
	C4	4	9
	C5	6	9
	C6	23	9

De nuevo se observó como la reacción alcanza un pH cercano a 9 a partir de las 2 h de reacción. Cabe remarcar que precisamente por el hecho de observar esta variación de pH con el tiempo, y que el tampón utilizado no era capaz de amortiguar el incremento de pH derivado de la eliminación del amoníaco al medio, aparentemente la eliminación del tampón no presenta ningún efecto observable sobre la conversión.

En el caso de que esta deriva en el valor pH pudiera ocasionar algún efecto pernicioso sobre la reacción, por ejemplo sobre la formación de impurezas, alternativamente a la tamponación del medio, se planteó la posibilidad de una neutralización en continuo mediante la adición de un ácido mineral adecuado. Esta opción se exploró más adelante (ver 9.4)

8.3. Estudio del efecto de la temperatura de reacción

Paralelamente, se contempló la posibilidad de aumentar la carga del reactor a partir de un aumento de la temperatura de reacción que permitiera una mayor solubilización del producto de partida¹⁸.

Dado que la máxima temperatura a la que es posible realizar la reacción viene limitada por la operabilidad del enzima en dichas condiciones, previamente, se verificó el comportamiento del enzima a distintas temperaturas. Así, se realizó la medida de actividad enzimática sobre la

¹⁸ Adicionalmente, existe la posibilidad de aumentar la carga del reactor por sobresaturación del producto de partida en el medio de reacción, a partir de una suspensión del intermedio 3.2. Este factor se discute en el apartado 9.2.

reacción tipo, determinando que hasta 45°C el enzima presenta un nivel de actividad adecuado. Temperaturas superiores conllevan una inactivación funcional del biocatalizador, por lo que se descartaron.

Fijada la máxima temperatura a alcanzar, se procedió a determinar la solubilidad de producto de partida y producto final en el medio, para establecer la concentración de saturación. Los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 43. Solubilidad determinada experimentalmente del producto de partida y del producto final a 45°C

Compuesto	Solubilidad (Tampón fosfato 30 mM, pH 7, 45°C)		Solubilidad (Agua, 45°C)	
	Intermedio 3.2	22 g/l	(41,6 mM)	23 g/l
Sofosbuvir	9 g/l	(17,0 mM)	9 g/l	(17,0 mM)

Para ello se realizaron dos experimentos, a máxima concentración de sustrato en ambos casos (15 mg/ml a 37°C y 22 mg/ml a 45°C).

Tabla 44. Condiciones de las reacciones R9A1 y R9A7 realizadas a máxima concentración de sustrato

Experimento	Temperatura (°C)	[Sustrato] (g/l)
R9A1	37	15
R9A7	45	22

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

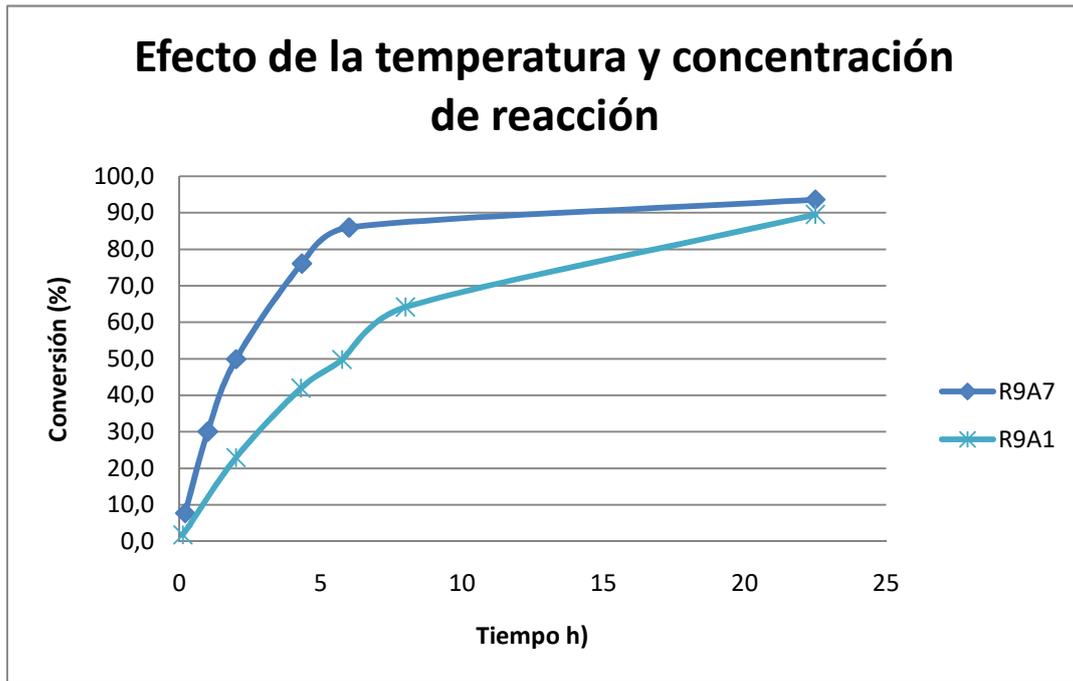


Imagen 51. Estudio del efecto de la temperatura y la concentración de sustrato en el medio

Tal como se muestra en la figura, se observó que cuando la reacción tiene lugar a 45°C, no sólo se consigue aumentar la capacidad de carga del reactor en sustrato, sino que también la cinética de la reacción se ve claramente favorecida, obteniéndose conversiones cercanas al 90% ya a las 5 horas, aproximadamente.

8.4. Estudio combinado del efecto de la temperatura y estequiometría de reacción

A la vista de los resultados obtenidos se decidió estudiar si a 45 °C se reproducía el mismo comportamiento en función de la estequiometría enzima/sustrato que el descrito a 37°C.

Partiendo de la estequiometría de referencia estudiada durante la PoC (1 equivalente), se procedió a modificar este parámetro para evaluar cuál es su efecto, principalmente sobre la cinética de la reacción.

Para ello se realizó una batería de cuatro experimentos, a 45°C y saturación de sustrato (22 g/l de producto de partida), combinando los parámetros:

Tabla 45. Condiciones de las reacciones R9A7 a R9A10, llevadas a cabo a 45°C

Experimento	Equivalentes Enzima
R9A7	1
R9A8	2
R9A9	2,5
R9A10	3

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

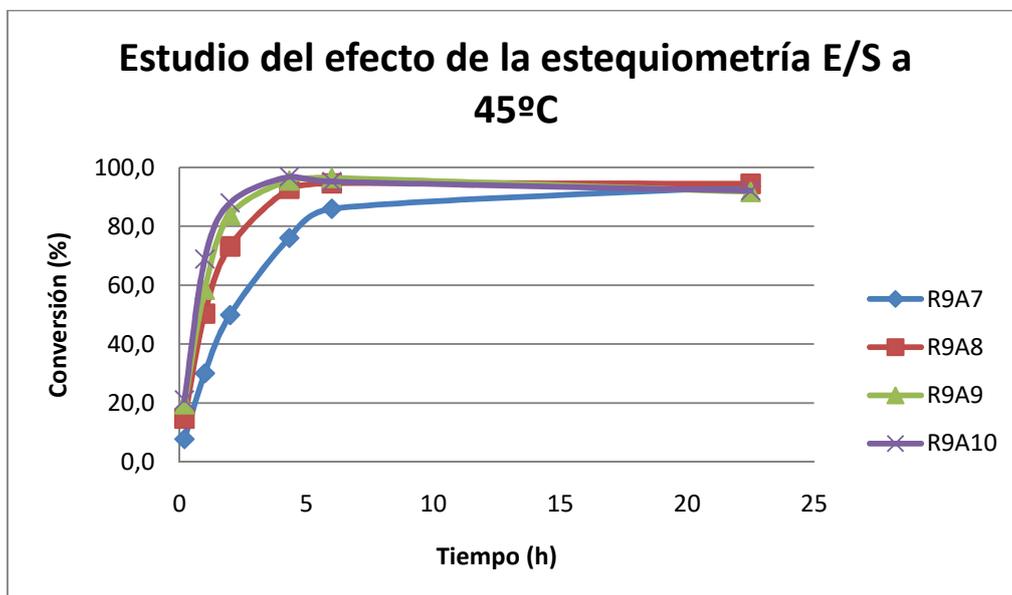


Imagen 52. Estudio combinado del efecto de la estequiometría enzima/sustrato a 45°C y saturación de sustrato, con 1 equivalente (R9A7), 2 equivalentes (R9A8), 2,5 equivalentes y 3 equivalentes (R9A10) de enzima

Tal y como se observa en los perfiles de reacción mostrados, respecto de la reacción control R9A7 donde se utilizó 1 equivalente de enzima, las reacciones R9A8 (2 equivalentes) a R9A10 (3 equivalentes) presentaron conversiones superiores, con una diferencia de hasta un 20% a mismos tiempos de reacción, a pesar de que todas ellas acabaron alcanzando conversiones superiores al 90% pasadas alrededor de 22 h de reacción. Las conversiones máximas se alcanzaron entre las 5 y 6 horas, siendo un tiempo de reacción suficiente para transformar cuantitativamente el producto de partida a producto final. Solamente en el caso de R9A7 la elongación del tiempo de reacción presentó una mejora en conversión del 8%.

Comparativamente con R9A8, los perfiles cinéticos de R9A9 (2,5 equivalentes) y R9A10 (3 equivalentes) presentan grandes similitudes a partir de las 5 horas, mientras que a tiempos inferiores de reacción la diferencia entre una estequiometría de 2 equivalentes a 3 equivalentes supone un incremento del 20% de conversión a tiempos inferiores, por ejemplo, a las 3 horas.

Por ello, el valor óptimo en caso de escalado comercial de la reacción deberá fijarse teniendo en cuenta el balance coste/beneficio entre el factor tiempo de reactor y relación estequiométrica de enzima vs. sustrato.

8.5. Estudio combinado de agua como medio de reacción a 45°C

A tenor de la información acumulada hasta este punto, se estudió el efecto conjunto de cambio de medio de reacción a agua sin tamponar, y aumento de temperatura a 45°C, con el concomitante aumento de concentración de sustrato (22 g/l). Este ensayo comparativo se realizó utilizando 1 equivalente de enzima en ambos casos para poder cotejar su comportamiento con la reacción de referencia en tampón fosfato (R9A7).

Los dos experimentos se realizaron a 45°C y saturación de sustrato (22 g/l de producto de partida), combinando los parámetros:

Tabla 46. Condiciones de las reacciones R9A7 y R9A15 para el estudio del uso de agua a 45°C como medio de reacción

Experimento	Medio de reacción
R9A7	Tampón fosfato 30 mM pH=7
R9A15	Agua desionizada

El perfil cinético de estos experimentos se muestra a continuación:

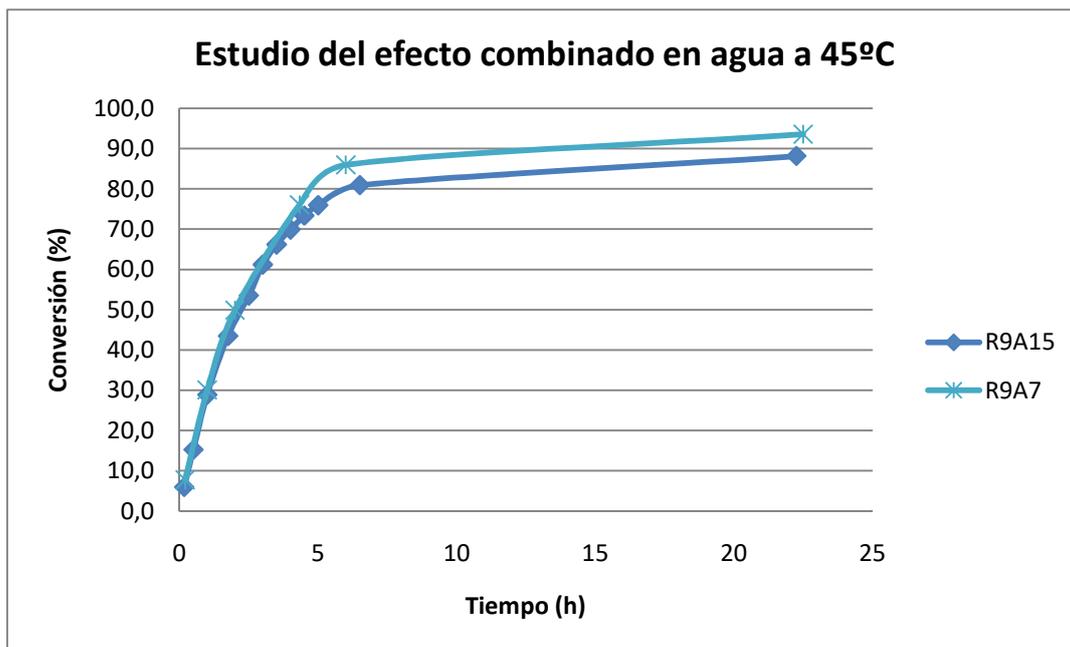


Imagen 53. Comparativa entre los perfiles de reacción llevadas a cabo a 45°C con 1 equivalente de enzima a saturación de sustrato en tampón fosfato (R9A7) y a 45°C con un equivalente de enzima a saturación de sustrato en agua sin tamponar (R9A15)

Ambos perfiles cinéticos se muestran idénticos a tiempos de reacción inferiores a 5 h, mostrando a partir de este punto una diferencia de un 5% en conversión, aproximadamente. Cabe remarcar que en este experimento, el agua como medio de reacción aparentemente presenta una conversión inferior al medio tamponado.

8.6. Estudio combinado del efecto agua como medio de reacción y estequiometría enzima/sustrato

Tras comprobar que la reacción era factible en agua, se procedió a estudiar su comportamiento aumentando la relación enzima/sustrato a 2,5 y 3 equivalentes, dado que los resultados utilizando 1 equivalente habían resultado más bajos de lo esperado.

Partiendo de la estequiometría de referencia en R9A15 (1 equivalente), se realizó una batería de experimentos, en agua, a 45°C y saturación de sustrato (22 g/l de producto de partida), variando el número de equivalentes de enzima:

Tabla 47. Condiciones de las reacciones R9A15 a R9A17 para el estudio de la estequiometría enzima / sustrato en agua a 45°C

Experimento	Equivalentes Enzima
R9A15	1
R9A16	2,5
R9A17	3

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

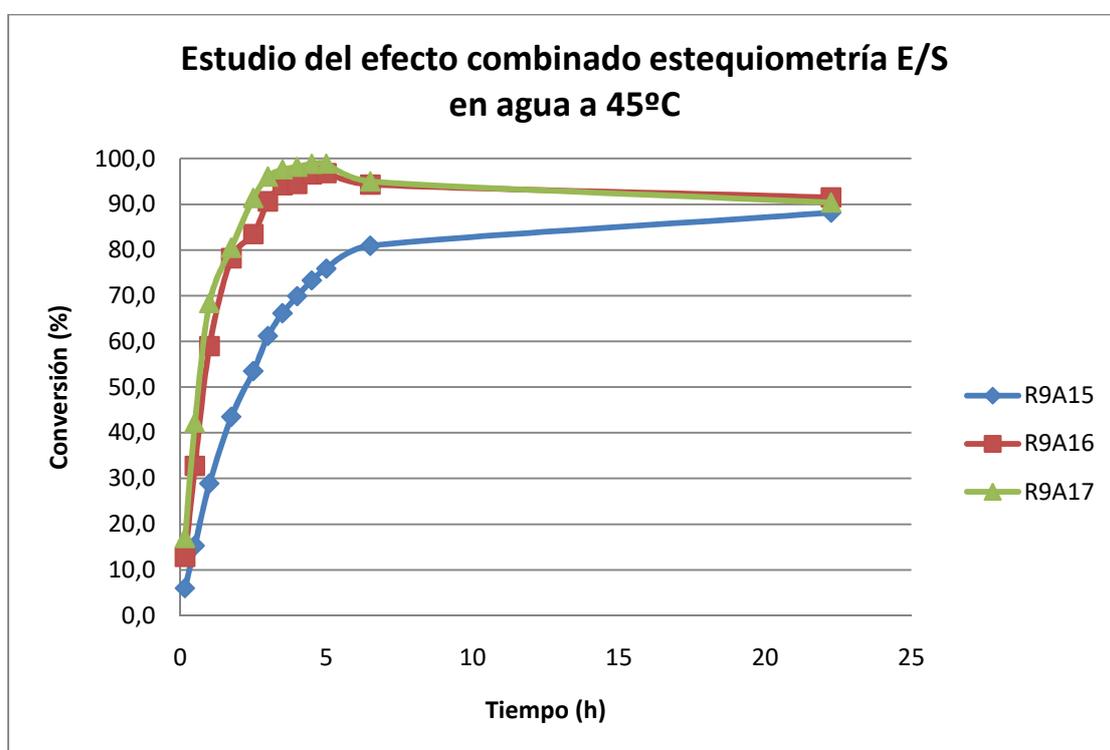


Imagen 54. Reacciones llevadas a cabo a 45°C con 1 equivalente de enzima a saturación de sustrato en agua (R9A15), a 45°C con 2,5 equivalentes de enzima a saturación de sustrato en agua (R9A16) y a 45°C con 3 equivalentes de enzima a saturación de sustrato en agua (R9A17)

Tal y como se observa en los perfiles de reacción mostrados, respecto de la reacción R9A15 donde se utilizó 1 equivalente de enzima, las reacciones R9A16 (2,5 equivalentes) y R9A17 (3 equivalentes) presentaron conversiones superiores, con una diferencia de hasta un 25% a mismos tiempos de reacción, a pesar de que todas ellas acabaron alcanzando conversiones superiores al 90% pasadas alrededor de 22 h de reacción.

Se apreció que a mayor relación estequiométrica, la conversión máxima se alcanza a tiempos más cortos, entre las 4 y 5 horas, siendo un tiempo de reacción suficiente para transformar cuantitativamente el producto de partida a producto final. Solamente en el caso de R9A17 la elongación del tiempo de reacción presentó una mejora en conversión alrededor del 8%.

Comparativamente, los perfiles cinéticos de R9A16 (2,5 equivalentes) y R9A17 (3 equivalentes) son prácticamente equivalentes, por lo que se consideró el óptimo en 2,5 equivalentes estequiométricos entre enzima y sustrato.

Nota:

La evolución del pH para estos experimentos se midió y se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 48. Evolución del pH durante el transcurso de las reacciones R9A15 a R9A17

Control de reacción	Tiempo (h)	pH crudo R9A15	pH crudo R9A16	pH crudo R9A17
C1	0,167	7	7,5	8
C2	0,5	8	9	9
C3	1	8,5	9	9
C4	1,75	9	9	9
C5	2,5	9	9	9
C6	3	9	9	9
C7	3,5	9	9	9
C8	4	9	9	9
C9	4,5	9	9	9
C10	5	9	9	9
C11	6,5	9	9	9
C12	22,25	9	9	9

Esta monitorización del pH permitió corroborar que, progresivamente, a medida que la cantidad de equivalentes de enzima aumenta, la basificación del medio transcurre a mayor velocidad y se detecta a tiempos más cortos de reacción, aunque en todos los experimentos realizados hasta la fecha, el valor de pH no superó las 9 unidades (medida semicuantitativa).

8.7. Perfil de impurezas de la reacción

La presencia de impurezas formadas durante el proceso de biocatálisis se exploró en cada uno de los experimentos realizados, y especialmente relevante resulta estudiar su evolución a medida que se modificaron los distintos parámetros de reacción.

Los principales picos cromatográficos detectados y atribuibles a impurezas formadas durante el proceso son:

Tabla 49. Impurezas detectadas formadas durante la reacción

Asignación	t_R (min)
Impureza 1	12,4
Impureza 2	15,1
Impureza 3	16,5

De todas ellas, la impureza 3 era la más abundante, y la que presentó mayor variación a medida que se forzaban las condiciones de reacción, viéndose favorecida su formación cuando aumenta la temperatura (de 37 a 45°C), la relación E/S (de 1 a 3 equivalentes) y el tiempo. El medio de reacción aparentemente también genera algún efecto sobre su incremento, dado que, en las mismas condiciones de reacción, cuando el medio estaba tamponado en fosfato potásico su contenido es inferior al medio tamponado en bicarbonato amónico, siendo este último equivalente a la cantidad de impureza observada cuando el medio de reacción era simplemente agua desionizada.

Más adelante se profundizó en el estudio de las impurezas, como se discute en el apartado 9.3.

9. Segunda fase de optimización de la reacción biocatalítica

9.1. Resumen de los logros conseguidos en la primera fase de optimización

Esta fase se inició a partir de los mejores resultados obtenidos durante la primera fase de optimización¹⁹. Las condiciones de reacción establecidas hasta la fecha fueron:

¹⁹ Descritas en el apartado anterior. La segunda fase de optimización se planteó tras haber completado los experimentos inicialmente propuestos, a la vista que la reacción tenía todavía recorrido para mejorar

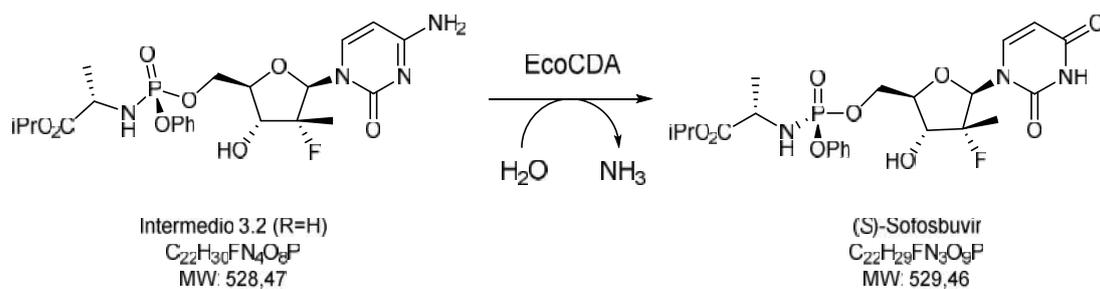


Imagen 55. Reacción de desaminación del intermedio 3.2 para la obtención de sofosbuvir.

Volumen de reacción: 4 ml

Concentración inicial de nucleósido sustrato (intermedio 3.2): 43,5 mM (23 g/l)²⁰

Disolvente de la reacción: agua (medio no tamponado)

Temperatura de reacción: 45°C

Tiempo de reacción estudiado: 24 horas / Agitación: magnética 300 rpm

Estequiometría enzima/sustrato:

0,5 equivalentes:	1,0 UA ²¹ /μmol (1,89 UA/mg)
1 equivalente:	2,0 UA/μmol (3,78 UA/mg)
2 equivalentes:	4,0 UA/μmol (7,56 UA/mg)

Tiempo de reacción hasta conversión cuantitativa:

0,5 equivalentes:	27,5 h ²²
1 equivalente:	24 h
2 equivalentes:	5 h

La monitorización de las reacciones se llevó a cabo durante 22-24 h, mediante la toma de controles intermedios de reacción. Las alícuotas tomadas se diluyeron inmediatamente con H₂O y MeOH y se filtraron por un filtro de 10 kDa sobre un soporte de tubo tipo eppendorf a 13000 rpm y 10 minutos.²³ Los crudos de reacción se analizaron por HPLC según el método descrito.

9.2. Estudio del efecto de sobresaturación del sustrato

9.2.1. Estudio preliminar

El objetivo de este apartado era determinar la posibilidad de aumentar la concentración de sustrato por encima de la concentración máxima en disolución, es decir, a sobresaturación de

²⁰ La concentración de 23 g/l corresponde a la máxima solubilidad de sustrato en H₂O y a 45°C

²¹ UA son las unidades para expresar la actividad enzimática definida como la cantidad de enzima que, en las condiciones de la reacción tipo, es capaz de transformar 1 micromol de sustrato por minuto

²² Datos obtenidos en medio tampón fosfato a pH 7

²³ Este tratamiento de la alícuota de control de proceso se realizó con el objetivo de eliminar restos biológicos que pudieran dañar el sistema cromatográfico, pero no es necesario en el proceso de tratamiento del crudo de reacción total (*work-up*)

sustrato, a concentraciones superiores a 23 g/l. De ser efectiva, esta variación permitiría incrementar la carga del reactor por cada lote producido.

Se realizaron dos experimentos comparativos, a 45°C y usando 3 equivalentes del enzima:

Tabla 50. Condiciones de las reacciones R9A18 y R9A19 a sobresaturación de sustrato.

Experimento	Concentración sustrato experimental (g/l)	Porcentaje de sobresaturación ²⁴ (%)
R9A18	24,5	6
R9A19	35,8	55

Tal y como se observa en los siguientes perfiles de reacción, ambos experimentos se comportaron prácticamente de la misma manera, por lo que para la misma estequiometría de enzima/sustrato, se demostró que es posible aumentar la concentración, consiguiendo una mayor transformación de producto por lote de producción:

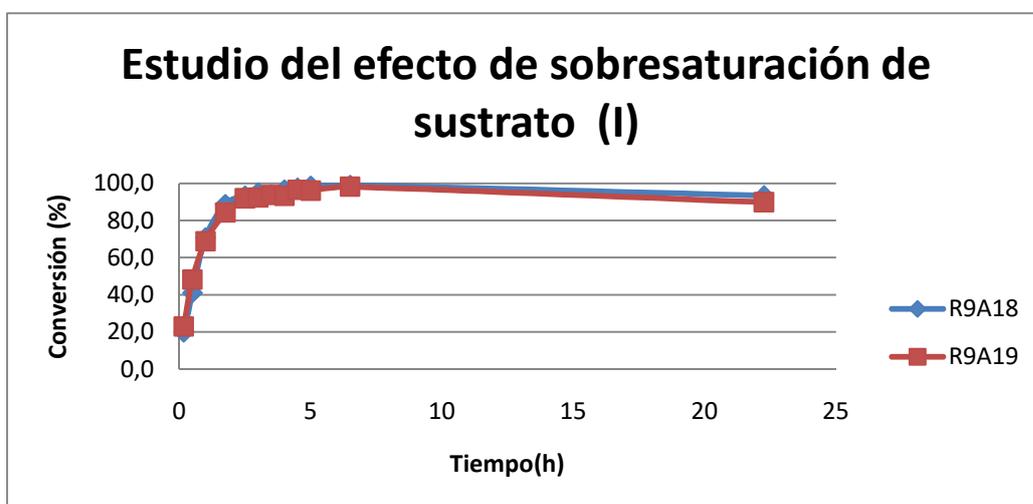


Imagen 56. Comparativa del perfil de reacción a concentración de sustrato superior a su solubilidad máxima, en iguales condiciones de reacción (45°C y 3 equivalentes de enzima)

A pesar de que la conversión resultó ser cuantitativa a tiempos de reacción cercanos a las 5 horas, en estas condiciones se observó como el perfil de impurezas de la reacción aumentó considerablemente respecto de experimentos anteriores, puesto que, aunque se dan las

²⁴ Respecto de la referencia de solubilidad máxima experimental correspondiente a 23 g/l

condiciones que favorecen la máxima formación de sofobuvir, en paralelo también se están favoreciendo las condiciones que generan estos subproductos no deseados²⁵.

Se observó que la aparición de estas impurezas iba en detrimento del porcentaje de sofobuvir formado, valor que progresivamente se alejaba del valor de conversión descrito, dado que aparentemente, la formación de la impureza 3 se origina a partir del producto sofobuvir.

9.2.2. *Estudio comparativo a distintos niveles de sobresaturación*

Continuando con el estudio presentado en el apartado anterior, pero con el objetivo de minimizar la cantidad de impurezas formadas, se procedió a ampliar el rango de porcentajes de sobresaturación estudiados, limitando la estequiometría enzima/sustrato a 2 equivalentes, para reducir la formación de impurezas.

Se realizaron tres experimentos comparativos, a 45°C y usando 2 equivalentes del enzima:

Tabla 51. Condiciones de las reacciones R9A20 a R9A22 a sobresaturación de sustrato.

Experimento	Concentración sustrato experimental (g/l)	Porcentaje de sobresaturación (ca %)
R9A20	39	70
R9A21	54	140
R9A22	67	190

²⁵ Como se ha indicado anteriormente (ver 8.7), la impureza 3 era la más abundante, y la que presentaba mayor variación a medida que se forzaban las condiciones de reacción, viéndose favorecida su formación cuando aumenta la temperatura (de 37 a 45°C), la relación E/S (de 1 a 3 equivalentes) y el tiempo.

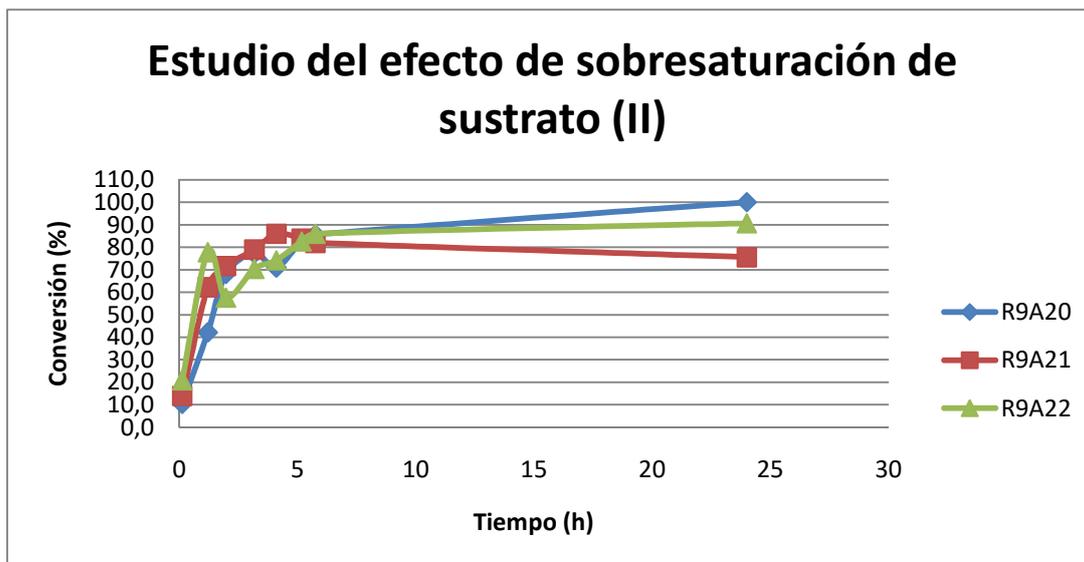


Imagen 57. Comparativa del perfil de reacción a concentración de sustrato superior a su solubilidad máxima, en iguales condiciones de reacción (45°C y 2 equivalentes de enzima)

Tal y como se observa en los anteriores perfiles de reacción, se consideró que los tres experimentos se comportaron prácticamente de la misma manera²⁶, y que era posible incrementar la productividad de la reacción en el sentido de incremento de la concentración de sustrato inicialmente en el medio²⁷ por unidad de reactor.

En este punto, y a pesar de que muy probablemente se pudiera haber continuado incrementando la cantidad de sustrato de partida, a las concentraciones indicadas la formación de impurezas en el medio alcanzó niveles insostenibles (las tres impurezas llegaron a sumar el 50% en área), por lo que se consideró que la optimización debía interrumpirse hasta conocer, controlar y/o minimizar el origen y tener alguna evidencia de la identidad de dichas impurezas (especialmente de la impureza 3, claramente muy mayoritaria).

Por ello, la optimización de la reacción se vio interrumpida en este punto por el estudio realizado para aportar luz a la formación y control de las citadas impurezas.

²⁶ Las ligeras variaciones observadas en los controles de reacción se atribuyen a la variabilidad asociada a la toma de muestra no suficientemente homogénea, dada la naturaleza de suspensión, que es más evidente a mayor sobresaturación de sustrato en la reacción.

²⁷ El aspecto físico de las reacciones donde se trabaja a sobresaturación, habitualmente sigue un patrón de comportamiento. Inicialmente, el Intermedio 3.2 es un sólido blanco que al introducirse en el medio de reacción, se transforma en una especie de pasta que dificulta la agitación de la reacción. A medida que va progresando la reacción, esta pasta va desapareciendo y da lugar a un sólido blanco fino que corresponde a sofosbuvir y que enturbia la reacción. Posteriormente, a medida que se va generando más cantidad de sofosbuvir, se van formando conglomerados de sólido que quedan adheridos a las paredes del balón de reacción, probablemente porque la agitación magnética utilizada era insuficiente para disgregarlos.

9.3. Estudio preliminar de las impurezas formadas durante la reacción

9.3.1. Perfil de impurezas de la reacción

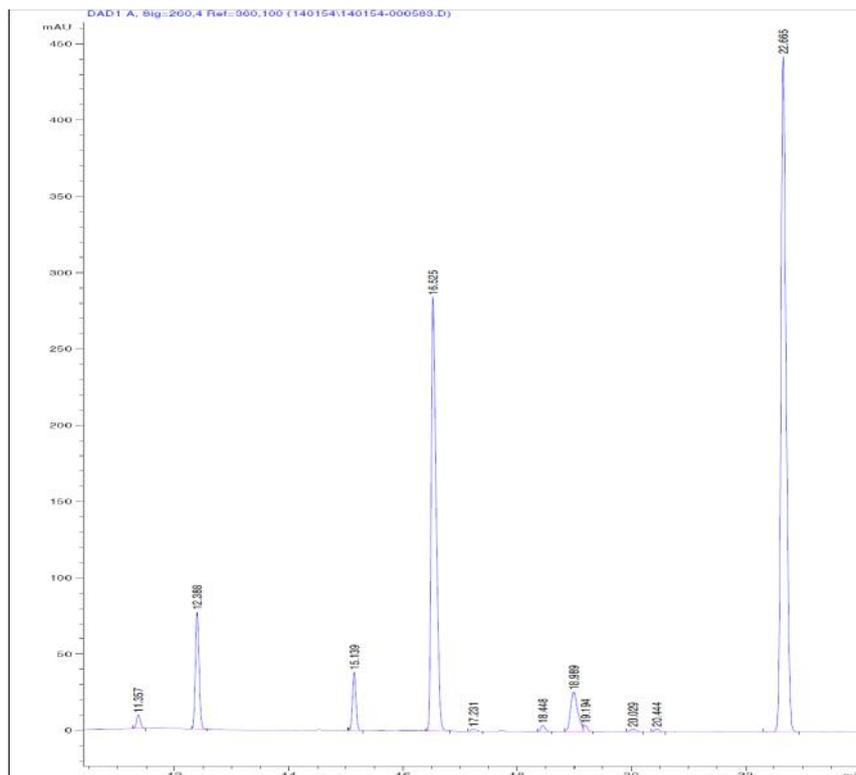
Tal y como ya se ha comentado anteriormente, los principales picos cromatográficos detectados y atribuibles a impurezas formadas durante el proceso fueron:

Tabla 52. Descripción de las impurezas detectadas en las reacciones de síntesis del sofosbuvir por HPLC

Asignación	t_R (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
Impureza 0	11,3	279-280
Impureza 1	12,4	262
Impureza 2	15,1	280
Impureza 3	16,5	262
Impureza 4	18,4	272

De todas ellas, la impureza 3 era la más abundante, y la que presenta mayor variación a medida que se fuerzan las condiciones de reacción, viéndose favorecida su formación cuando aumenta la temperatura (de 37 a 45°C), la relación E/S (de 1 a 3 equivalentes) y el tiempo. El medio de reacción aparentemente también generó algún efecto sobre su incremento, dado que, en las mismas condiciones de reacción, cuando el medio estaba tamponado la cantidad de impureza es inferior a cuando el medio de reacción era simplemente agua desionizada.

A continuación se muestra un cromatograma representativo donde se muestran dichas impurezas. El pico a 22,66 minutos corresponde a sofosbuvir.



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.139	BB	0.0501	8.09039	2.47879	0.1499
2	4.124	BB	0.0473	11.29263	3.72925	0.2092
3	11.357	BB	0.0718	42.11280	9.14073	0.7803
4	12.388	BB	0.0688	348.27609	76.97427	6.4531
5	15.139	BB	0.0676	164.18518	38.64897	3.0421
6	16.525	BB	0.0889	1729.58301	284.44766	32.0469
7	17.231	BB	0.0882	9.63137	1.64783	0.1785
8	18.448	BB	0.0837	22.70741	4.16089	0.4207
9	18.989	BV	0.1221	213.33952	25.89735	3.9529
10	19.194	VB	0.0696	18.48381	4.02292	0.3425
11	20.029	BB	0.1004	11.92636	1.82201	0.2210
12	20.444	BB	0.0868	10.84935	1.89605	0.2010
13	22.665	BB	0.0939	2806.56494	442.90915	52.0019

Totals : 5397.04288 897.77588

Imagen 58. Ejemplo de cromatograma donde se observan las impurezas generadas durante la reacción

9.3.2. Hipótesis de trabajo

Teniendo en cuenta que a medida que progresa la reacción de desaminación se desprende NH_3 como coproducto de la reacción, el control y monitorización de pH se consideró desde el inicio del proyecto como un factor clave. Es por ello que inicialmente se trabajaba en medio de tampón fosfato 30 mM a pH 7, esperando que éste fuera suficiente para mantener estable este valor. A pesar de ello, y tal y como se ha indicado anteriormente, ni el tampón fosfato ni el tampón bicarbonato 30 mM a pH 7 conseguían mantener estable el valor de pH a medida que progresa la reacción, alcanzando las 9-9,5 unidades (medida semicuantitativa) en todos los

casos, a tiempos más cortos a medida que la cinética de la reacción se incrementa, bien por aumento de temperatura, de catalizador y/o de concentración de sustrato.

Esta situación comportaba la presencia de dos especies nucleófilas en el medio de reacción, OH⁻ y NH₃, potencialmente “vivas” sobre los distintos centros electrófilos que presentan tanto el producto de partida como el producto final.

Por todo ello, y como principal hipótesis de trabajo, en el presente estudio la formación de dichas impurezas se atribuyó a reacciones secundarias paralelas y competitivas que tenían lugar a través de una, otra o ambas especies nucleófilas, ya sea por la propia inestabilidad de reactivo y/o sustrato en estas condiciones (e.g. inestabilidad química), o bien debida a reactividad competitiva catalizada por algún componente presente en el formato del biocatalizador utilizado (e.g. inestabilidad enzimática).

La principal vía de control de la formación de impurezas, de confirmarse esta hipótesis, debía pasar por un estricto control de la evolución del pH de la reacción, manteniendo este parámetro constantemente cercano a un valor por definir.

Así pues, para verificar dicha hipótesis, la primera tarea a realizar consistió en el estudio del comportamiento del intermedio 3.2. y de sofosbuvir en las condiciones citadas, según se describe en los siguientes apartados.

9.3.3. *Estudio de estabilidad del sustrato intermedio 3.2.*

9.3.3.1. *Estudio de estabilidad química del sustrato intermedio 3.2.²⁸*

Se llevaron a cabo dos experimentos de forma paralela a una concentración de 43 mM (máxima solubilidad):

- En H₂O a pH= 7,07
- En H₂O basificada a pH= 9,61²⁹

Tabla 53. Controles e impurezas formadas en los experimentos para evaluar la estabilidad química del sustrato.

Muestra	Control	Tiempo (h)	% Área			
			Intermedio 3.2.	Impureza 1	Impureza 2	Impureza 3
3.2. pH=7,07	C2	3	98,36	0	0,44	0
	C3	23	97,4	0	0,77	0
3.2. pH=9,61	C2	3	97,32	0	1,31	0
	C3	23	96,07	0	2,06	0

²⁸ En el estudio de estabilidad del sustrato intermedio 3.2., no se llevó a cabo el estudio de estabilidad enzimática, ya que correspondía a llevar a cabo la propia reacción de formación de sofosbuvir

²⁹ La reacción en medio básico se llevó a cabo con el mismo lote que en la prueba a pH neutro, pero en este caso, se basificó con NH₃, ya que es una de las especies presente en el medio de reacción

En ambos casos, se tomaron controles a 3 y 23 horas y se analizaron por HPLC. Se observa, tanto a pH neutro como a pH básico, como apareció un pequeño porcentaje de Impureza 2, que aumenta con el tiempo siendo superior a pH básico que neutro, alcanzando el 2% de área respecto del área de intermedio 3.2.

De este estudio resulta que aparentemente la impureza 2 proviene del intermedio 3.2. y se favorece a pH más básicos. Si se analiza el perfil de UV tanto del intermedio 3.2 como de la impureza 2, ambas presentan un $\lambda_{\text{máx}} = 272 \text{ nm}$, hecho que confirma que dicha impureza se asemeja más al intermedio 3.2 que a sofobuvir, supuestamente presentando el mismo grupo cromóforo o equivalente.

9.3.4. Estudio de estabilidad del enzima

Se llevaron a cabo dos estudios de forma paralela añadiendo la cantidad de enzima que correspondería a adicionar dos equivalentes:

- En H₂O a pH= 7,07
- En H₂O basificada a pH= 9,61

Tabla 54. Controles e impurezas formadas en los experimentos para evaluar la estabilidad del enzima.

Muestra	Control	Tiempo (h)	% Área			
			tr=4,12 min	Impureza 1	Impureza 2	Impureza 3
Enzima pH=7,07	C3	23	44,29	0	0	0
Enzima pH=9,61	C3	23	41,77	0	0	0

En ambos casos, se tomó un control a las 23 h y se analizó por HPLC. En este caso, no se observa ninguna de las tres impurezas en estudio. La única señal remarcable en ambos ensayos es a tr=4,12 minutos, que corresponde a un 45% de área del total y que en los análisis de reacción, en función de la cantidad de enzima añadido, se observa en mayor porcentaje. En este caso, cabe destacar que no se observa influencia del pH.

Por lo tanto, de este estudio se pudo confirmar que las impurezas observadas no provienen del extracto enzimático original ni de ninguna posible degradación que pudiera producirse en las condiciones de reacción.

9.3.5. Estudio de estabilidad de sofosbuvir

9.3.5.1. Estudio de estabilidad química de sofosbuvir

Se llevaron a cabo dos estudios de forma paralela y de forma equivalente al sustrato intermedio 3.2.:

- En H₂O a pH= 7,14
- En H₂O basificada a pH= 9,65

Tabla 55. Controles e impurezas del estudio de la estabilidad química del sofosbuvir.

Muestra	Control	Tiempo (h)	% Área				
			Sofosbuvir	Impureza 1	Impureza 2	Impureza 3	tr=4,12 min
SOFOSBUVIR pH=7,14	C1	3	99,25	0,01	0	0,1	0
	C2	25	98,96	0,06	0	0,35	0
SOFOSBUVIR pH=9,65	C1	3	97,88	0,12	0	0,77	0
	C2	25	97,34	0,29	0	1,66	0

En ambos casos, se tomaron controles a 3 y 25 horas, y se analizaron por HPLC. Se observa tanto a pH neutro como a pH básico, como apareció un pequeño porcentaje de Impureza 1 y de Impureza 3, que aumentaban con el tiempo, siendo superiores a pH básico que neutro.

9.3.5.2. Estudio de estabilidad enzimática de sofosbuvir

Se llevaron a cabo dos estudios de forma paralela y de forma equivalente al estudio de estabilidad química:

- En H₂O a pH= 7,14
- En H₂O basificada a pH= 9,65

Tabla 56. Controles e impurezas del estudio de estabilidad enzimática del sofosbuvir.

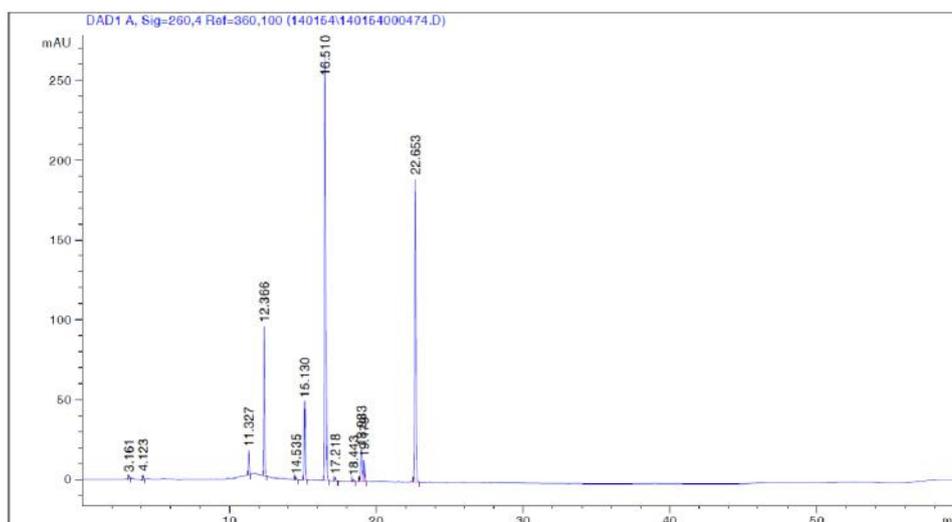
Muestra	Control	Tiempo (h)	% Área				
			Sofosbuvir	Impureza 1	Impureza 2	Impureza 3	tr=4,12 min
SOFOSBUVIR + enzima pH=7,14	C1	3	96,88	0,08	0	0,53	0,5
	C2	25	95,33	0,34	0	1,99	0,46
SOFOSBUVIR + enzima pH=9,65	C1	3	95,88	0,12	0	0,8	0,65
	C2	25	93,39	0,5	0	2,86	0,59

De forma análoga al estudio de estabilidad química, en ambos casos, se tomaron controles a 3 y 25 horas, y se analizaron por HPLC. Se observa, tanto a pH neutro como a pH básico, como se forman las impurezas 1 y 3, y que su porcentaje aumenta con el tiempo. De manera análoga a los estudios previos, el porcentaje de impurezas presente es superior a pH básico.

Del estudio de estabilidad química y enzimática de sofosbuvir resulta que aparentemente las impurezas 1 y 3 provienen de sofosbuvir, con absorbancia similar a éste ($\lambda_{\text{máx}}(\text{sofosbuvir}) = 260 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{máx}}(\text{Impurezas 1 y 3}) = 262 \text{ nm}$), supuestamente presentando el mismo grupo cromóforo o equivalente. Es de remarcar el aumento de impureza a pH básico, por tanto, se confirmó la hipótesis inicial, es decir que la presencia de NH_3/OH^- en el medio favorece su formación, y que por tanto, era un factor clave a controlar.

9.3.6. Aislamiento a pequeña escala de las principales impurezas

Con el objetivo de disponer de una pequeña muestra de cada impureza por separado para, como mínimo, analizar cada fracción mediante espectrometría de masas y disponer de algún dato preliminar de caracterización estructural, se procedió a purificar mediante HPLC analítico parte del crudo de reacción R9A22 (hasta la fecha, el que contenía mayor porcentaje de impurezas).



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.161	BB	0.0662	11.30707	2.43293	0.2971
2	4.123	BB	0.0556	12.71177	3.40407	0.3340
3	11.327	BB	0.0689	69.55192	15.33632	1.8273
4	12.366	BB	0.0698	434.33649	94.24535	11.4108
5	14.535	BB	0.0749	5.47011	1.12242	0.1437
6	15.130	BB	0.0677	210.29517	49.39591	5.5249
7	16.510	BB	0.0894	1626.77039	265.81171	42.7383
8	17.218	BB	0.0860	11.89485	2.04028	0.3125
9	18.443	BB	0.0855	7.40774	1.36117	0.1946
10	18.983	BV	0.1166	156.14601	20.10378	4.1023
11	19.179	VB	0.0731	64.77982	13.23381	1.7019
12	22.653	BB	0.0933	1195.67908	190.39951	31.4127

Imagen 59. Cromatograma de la reacción R9A22 a 46 h

Para ello, se verificó el comportamiento del mismo método cromatográfico inicial, eliminando el ácido fosfórico de la fase móvil para evitar problemas de posible hidrólisis ácida al concentrar las fracciones. Se ensayaron dos métodos:

- FM1: TFA 0,05% /ACN pH 2,26
- FM2: H₂O/ACN pH 7,00

La FM1 permite evaporar con facilidad el ácido trifluoroacético (a diferencia del H₃PO₄) a la vez que mantener los perfiles de UV inalterados respecto de los observados en el método original, dado que la protonación de los distintos productos no cambia si el valor de pH se mantiene.

Con la FM2 los tiempos de retención y los perfiles de UV de algunas de las sustancias se ven alteradas, a pesar de ello, se consigue una buena resolución de las señales de interés y unido a que las fracciones aisladas eran más limpias que usando ácido trifluoroacético en la FM, el uso de la FM2 fue la elección para llevar a cabo la purificación de las impurezas.

Se prepararon muestras de concentración aproximada 2000, 5000, 20000 y 40000 ppm, y se inyectaron distintos volúmenes, hasta establecer el valor que a cada concentración permitía mantener la resolución entre picos.

De esta manera, se recogieron cinco fracciones distintas, atribuidas a los distintos picos desconocidos que eluyen en el cromatograma de la muestra R9A22, correspondientes a los siguientes tiempos de retención:

Tabla 57. Diferentes t_R según el método utilizado de las impurezas en estudio.

Asignación	Método purificación	Método analítico
	t_R (min) ³⁰	t_R (min) ³¹
Impureza 0	1,8	11,4
Impureza 1	2,4	12,4
Impureza 2	11,7	15,1
Impureza 3	12,8	16,5
Impureza 4	19,0	18,4

³⁰ Programa de gradiente con cambio de composición a H₂O /ACN pH 7,00

³¹ Programa usando 0,1% H₃PO₄ /ACN pH 2,30

Una vez recolectadas, cada fracción se evaporó a sequedad y se reanalizó para determinar su pureza:

Tabla 58. Cantidad y pureza de las impurezas aisladas.

Asignación	t _R (min) ³²	Pureza (área, %)	Cantidad aislada (mg)
Impureza 0	11,4	42,7	4,8
Impureza 1	12,4	91,5	5,4
Impureza 2	15,1	96,8	1,9
Impureza 3	16,5	98,0	6,9
Impureza 4	18,4	8,7	ca 1

9.3.7. *Análisis de las fracciones colectadas mediante cromatografía de masas (MS²)*

A continuación se procedió al análisis de las distintas fracciones usando el equipo ESI Ion Trap Esquire 4000 de Bruker, con introducción directa de la muestra en modo Electrospray (ion spray) (ESI-MS) para el análisis de masas con lectura de iones en modo positivo y en modo negativo³³. Las muestras se prepararon a una concentración aproximada de 10 ppm en MeOH de calidad LC/MS.

En cada uno de los modos de detección, las señales de mayor intensidad, atribuidas a los iones moleculares, se aislaron y fragmentaron, tanto en modo positivo como en modo negativo.

Previamente, se verificó que el método utilizado era adecuado, mediante el análisis de las muestras de sustrato (intermedio 3.2.) y de sofobuivir, obteniendo en cada caso perfiles de ionización en modo positivo y negativo, así como su patrón de fragmentación, perfectamente interpretables en base a la estructura química de las moléculas analizadas³⁴.

Desafortunadamente, el comportamiento de las muestras de impurezas se manifestó de manera distinta. Exceptuando la impureza 3, en todos los casos se obtuvieron señales de baja intensidad, posiblemente debido a muestras de menor concentración a la estimada³⁵ o por

³² Según el método de aislamiento

³³ Condiciones del equipo: capillary: Ramp Range 1500-4500 V; drying gas: 4.0 L/min.; neb. Press.: 10 Psi; gas temp.: 250°C; scan: 100-900 m/z

³⁴ Pérdidas de masa muy características son: HF (M-20) y PhOH (M-94) en ambos casos

³⁵ Por sobreestimación de peso final de producto colectado

poca ionización de los productos en las condiciones del método escogido. Por todo ello, estos datos no fueron suficientemente inequívocos para ser considerados como potenciales valores de pesos moleculares, y no se tuvieron en consideración y por lo tanto no se reportan.

El espectro de masas de la impureza 3 muestra los iones que se indican en la siguiente tabla, junto con un resumen de sus asignaciones, en base a dos posibles asignaciones:

Tabla 59. Resultados obtenidos de m/z y asignaciones en el análisis de la Impureza 3.

Producto	Ionización	m/z	Asignación 1	Asignación 2
Impureza 3	ESI (+)	476	[M+H] ⁺ de compuesto de PM ₁ =475	[M+Na] ⁺ de compuesto de PM ₂ =453
		498	[M+Na] ⁺ de compuesto de PM ₁ =475	Ión no atribuible a PM ₂
	ESI (-)	452	Ión no atribuible a PM ₁	[M-H] ⁻ debida a PM ₂ =453

Aunque la asignación de los datos de MS no fue concluyente, en base a los iones observados y especialmente a la comparativa del patrón de fragmentación de la impureza 3 respecto de la fragmentación de los patrones de sustrato y sofosbuvir, es remarcable la ausencia de pérdida de grupo PhOH, aunque se mantiene la pérdida de grupo HF.

9.3.8. Elucidación tentativa de la impureza 3

Hasta este momento, teniendo en cuenta los datos disponibles, la principal hipótesis derivada de este estudio preliminar de impurezas fue que una posible estructura atribuible a la impureza 3 pudiera ser:

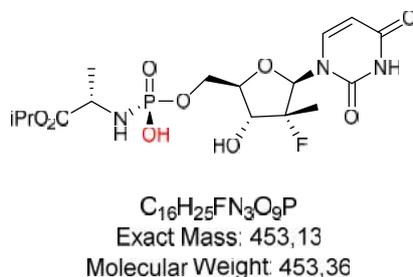


Imagen 60. Potencial estructura molecular atribuible a la impureza 3

De ser así, su formación pudiera deberse al ataque nucleofílico de OH⁻ sobre el P electrófilo, con eliminación de grupo fenol.

Cabe remarcar que esta misma reacción podría también darse sobre la estructura del sustrato, por lo que alguna de las impurezas restantes podría ser la homóloga sobre el intermedio 3.2.

9.4. Estudio del efecto del control de pH

9.4.1. Estudio preliminar

En base a las hipótesis anteriores, se estableció como prioritario el estudio de la reacción con estricto control de pH. En primer lugar y dado que hasta la fecha la monitorización de pH se venía realizando de manera semicuantitativa, se realizó una batería de dos experimentos en idénticas condiciones de reacción³⁶, aunque a volúmenes superiores (50 y 80 ml, respectivamente), necesarios para poder medir de manera continua la evolución del pH del medio a medida que progresa la reacción:

Tabla 60. Condiciones de las reacciones R9A23 y R9A24 en que se monitorizó el pH en continuo.

Experimento	Control de pH	Intervalo máximo de variación de pH
R9A23	No	6,60 ³⁷ -8,42
R9A24	Sí	6,60-7,46

Los resultados obtenidos se muestran y se discuten a continuación:

- **Sin ajuste de pH:**

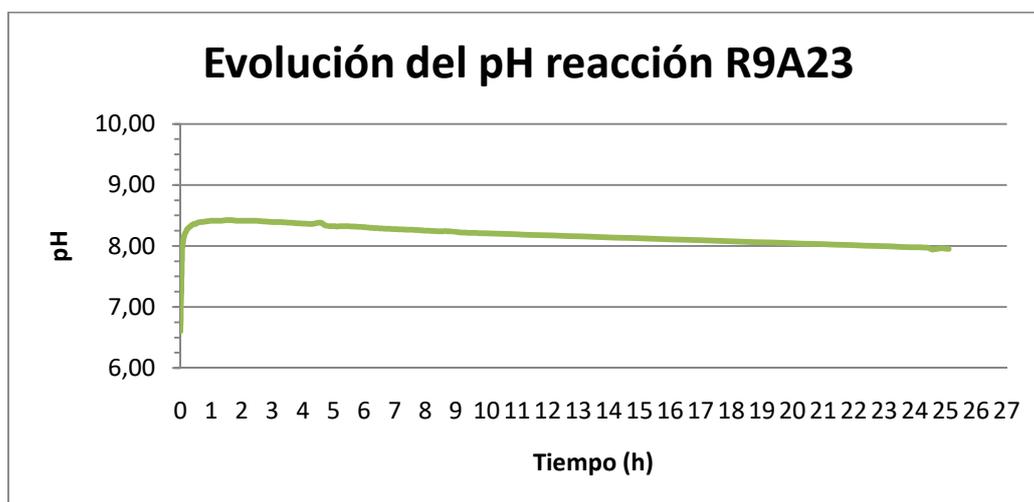


Imagen 61. Evolución del pH en medio no regulado

³⁶ Ver detalles experimentales en el Anexo 1

³⁷ pH de la mezcla de reacción una vez añadido el intermedio 3.2

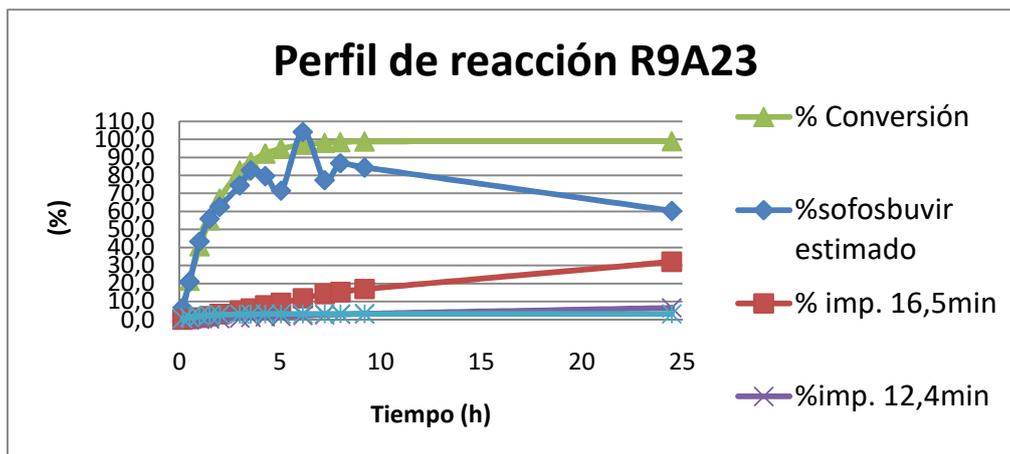


Imagen 62. Evolución de la reacción en medio sin ajuste de pH, comparando valores de conversión (%) y sofosbuvir formado (%)³⁸, respectivamente, así como porcentaje de área de HPLC para las tres impurezas mayoritarias

De los resultados anteriores se desprende que, de manera reproducible a todo lo descrito hasta la fecha, la conversión de sustrato 3.2. a sofosbuvir alcanzó valores cuantitativos sobre las cinco horas de proceso, en estas condiciones.

El progreso de la reacción en términos de porcentaje de sofosbuvir formado respecto de sofosbuvir esperado coincide con el porcentaje de conversión hasta un cierto punto en el que, también afectado por una toma de muestra no representativa de la suspensión total, la línea de sofosbuvir formado (%) se desvía de la línea de conversión (%), con una disminución clara de contenido en sofosbuvir a partir de las 8 horas de reacción.

Esta involución de contenido en producto principal coincide perfectamente con un incremento extraordinario del contenido en impurezas, especialmente en impureza 3, que, aparentemente podía ser el producto resultante de una reacción secundaria, paralela y competitiva cuyo sustrato era el propio sofosbuvir. Las otras dos impurezas, aunque aumentaron de manera más sostenida en el tiempo, se encontraban en porcentajes completamente indeseables.

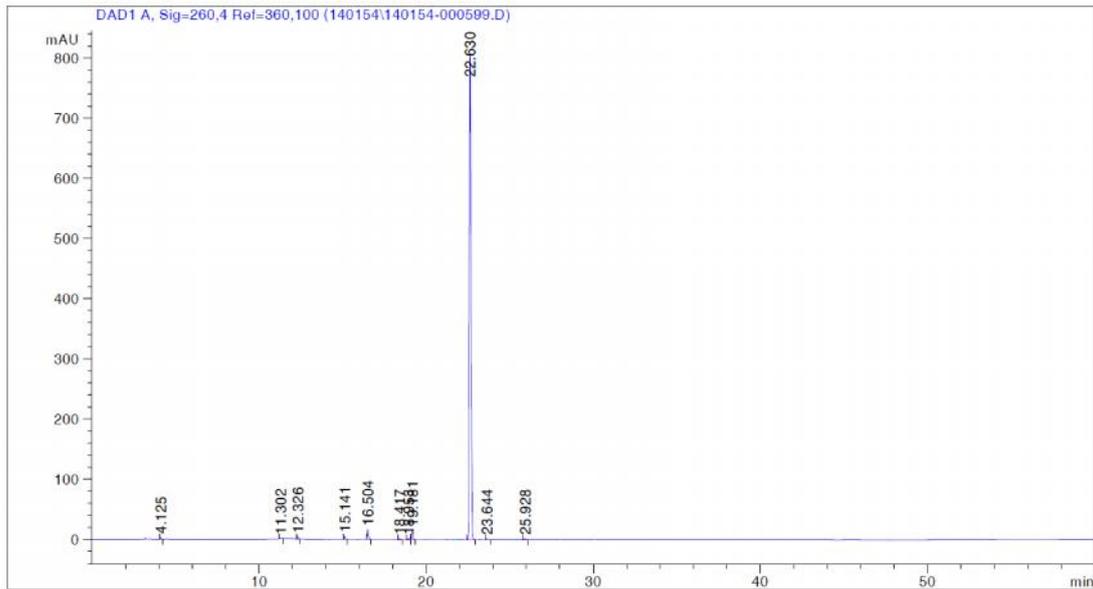
³⁸ Puesto que la reacción es una suspensión, la toma de muestra en algunos puntos puede no ser homogénea y ocasionar algunos valores anómalos, tal como los observados en el gráfico.

Tabla 61. Controles e impurezas de la R9A23 con monitorización pero sin corrección de pH.

Código Reacción	Control reacción	Tiempo (h)	Impureza 1 (%) tr=12,4min	Impureza 2 (%) tr=15,1min	Impureza 3 (%) tr=16,5min
R9A23	C1	0,16	0	0,44	0
	C2	0,5	0	1,16	0,3
	C3	1	0,16	1,9	1,02
	C4	1,5	0,31	2,33	1,87
	C5	2	0,5	2,65	2,96
	C6	3	0,89	2,9	5,07
	C7	3,5	1,11	2,99	6,13
	C8	4,3	1,43	3,05	7,79
	C9	5,05	1,69	3,07	9,17
	C10	6,1	2,19	3,11	11,82
	C11	7,2	2,65	3,12	14,13
	C12	8	2,87	3,11	15,19
	C13	9,2	3,23	3,1	16,92
	C14	24,5	6,45	3,04	32,05

▪ **Con ajuste de pH a valores $6,60 < \text{pH} < 7,5$:**

Para confirmar el efecto que un ajuste de pH a valores inferiores pudiera tener sobre este comportamiento, se procedió a realizar el experimento R9A24, donde el valor de pH se mantuvo en un intervalo estrecho de variación, siempre inferior a 7,5, mediante la adición controlada de pequeños volúmenes (hasta 110 μl) de una disolución de ácido acético 1 M. El tiempo de monitorización de reacción fue de 8 horas. El volumen total añadido fue de 1,77 ml.



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.125	BB	0.0500	8.91925	2.73488	0.1619
2	11.302	BB	0.0832	5.70128	1.02038	0.1035
3	12.326	BB	0.0706	16.27972	3.61064	0.2955
4	15.141	BB	0.0690	23.91841	5.47176	0.4342
5	16.504	BB	0.0842	90.64217	16.47255	1.6454
6	18.417	BB	0.0825	8.34550	1.55790	0.1515
7	18.953	BV	0.1150	14.26701	1.82949	0.2590
8	19.181	VB	0.0723	73.15672	15.73233	1.3280
9	22.630	RB	0.0976	5240.89697	808.94678	95.1375
10	23.644	BB	0.1024	12.46352	1.76518	0.2262
11	25.928	BB	0.1040	14.16966	2.01700	0.2572

Totals : 5508.76022 861.15889

Imagen 63. Cromatograma del control de reacción de R9A24 a 7,5h

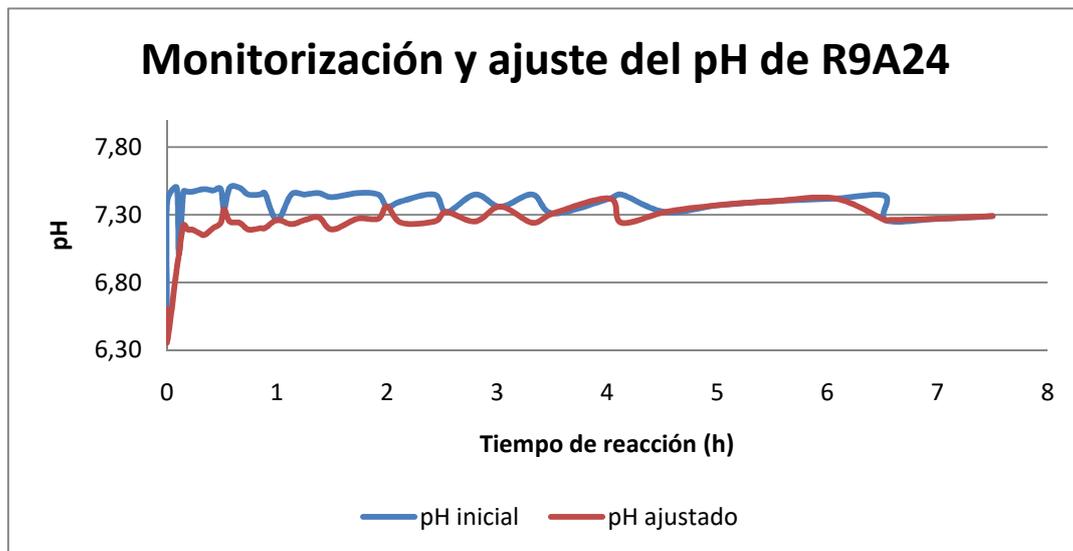


Imagen 64. Evolución del pH en medio ajustado entre 7,1 y 7,5

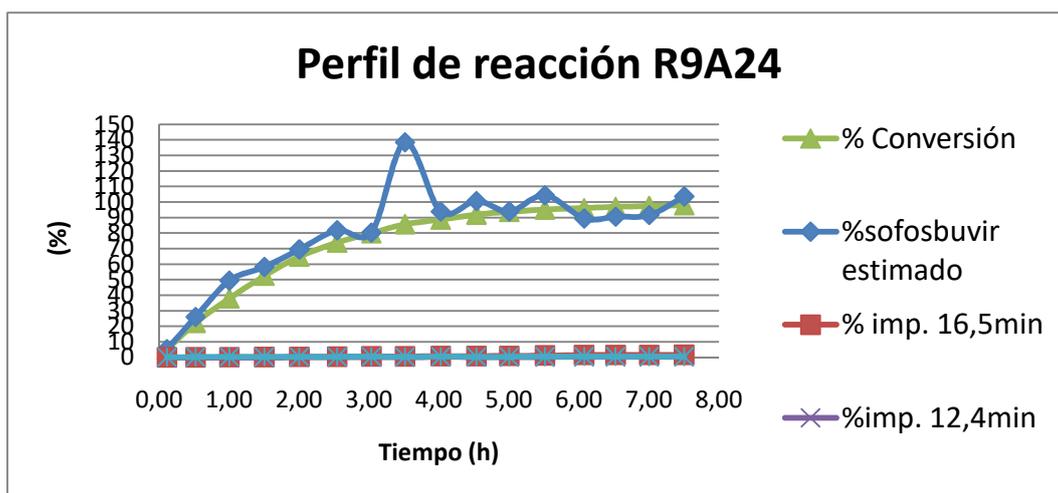


Imagen 65. Evolución de la reacción con el ajuste de pH entre 7 y 7,5 aproximadamente, comparando valores de conversión (%) y sofosbuvir formado (%)³⁹, así como el porcentaje de área de HPLC para las tres impurezas mayoritarias. Puede observarse como su presencia disminuye significativamente

En términos de conversión, la transformación fue cuantitativa a los mismos tiempos que antes, aunque dos valores son especialmente relevantes:

- Durante todo el progreso de la reacción, el porcentaje de sofosbuvir formado respecto del esperado siguió la misma tendencia que la conversión, con valores finales estimados entre el 90 y 100%.
- La cantidad de impurezas formadas durante el progreso de la reacción se vio claramente minimizada (ver ampliación a continuación), en especial la formación de la impureza 3 (tr=16,5 min), por lo que se confirmó la incidencia de la presencia de OH⁻ y/o NH₃ libres sobre su formación. A pesar de ello siguió siendo la impureza mayoritaria.

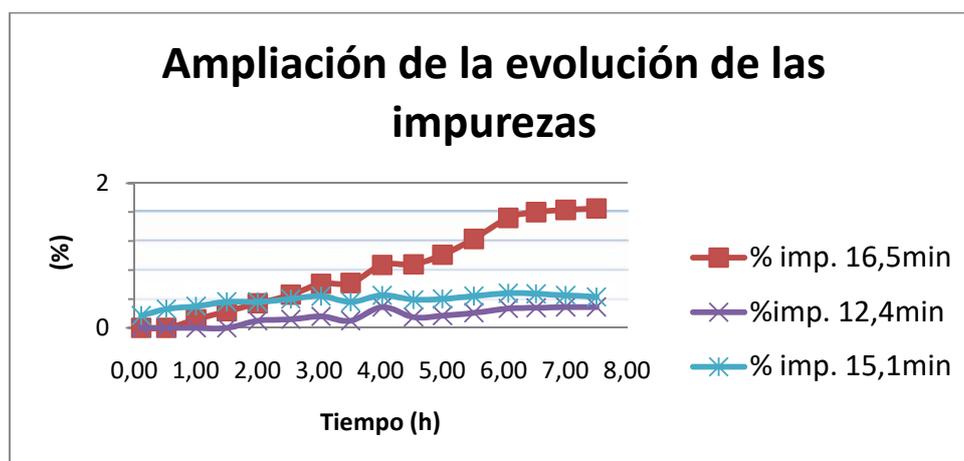


Imagen 66. Ampliación de la proporción y evolución de las principales impurezas en función del progreso de la reacción R9A24

³⁹ Puesto que la reacción es una suspensión, la toma de muestra en algunos puntos puede no ser homogénea y ocasionar algunos valores anómalos, tal como el observado aproximadamente a 3,5 h de reacción

Tabla 62. Controles e impurezas de la R9A24 con monitorización y corrección de pH

Código Reacción	Control reacción	Tiempo (h)	Impureza 1 (%) tr= 12,4min	Impureza 2 (%) tr= 15,1min	Impureza 3 (%) tr= 16,5min
R9A24 (ajuste pH 7,2 a 7,5)	C1	0,11	0	0,17	0
	C2	0,52	0	0,26	0
	C3	1	0	0,3	0,12
	C4	1,5	0	0,36	0,23
	C5	2	0,1	0,36	0,34
	C6	2,5	0,12	0,4	0,46
	C7	3,0	0,16	0,44	0,61
	C8	3,5	0,1	0,36	0,62
	C9	4,0	0,29	0,45	0,87
	C10	4,5	0,15	0,39	0,88
	C11	5	0,17	0,4	1,01
	C12	5,5	0,21	0,44	1,23
	C13	6,1	0,27	0,48	1,52
	C14	6,5	0,28	0,47	1,6
	C15	7	0,29	0,45	1,63
	C16	7,5	0,29	0,43	1,65

9.4.2. Estudio comparativo a distintos intervalos de pH

En base a los resultados anteriores, se amplió el estudio del efecto del pH sobre la formación y evolución de las impurezas formadas durante la reacción, realizando los siguientes experimentos:

Tabla 63. Condiciones de las reacciones R9A29 y R9A30 con control de pH

Experimento	Control de pH	Intervalo máximo de variación de pH
R9A29	Sí	6,60 ⁴⁰ -7,00
R9A30	Sí	6,35 ⁴¹ -6,55

1. Ajuste a valores $6,60 < \text{pH} < 7,0$:

Los resultados obtenidos se muestran y se discuten a continuación:

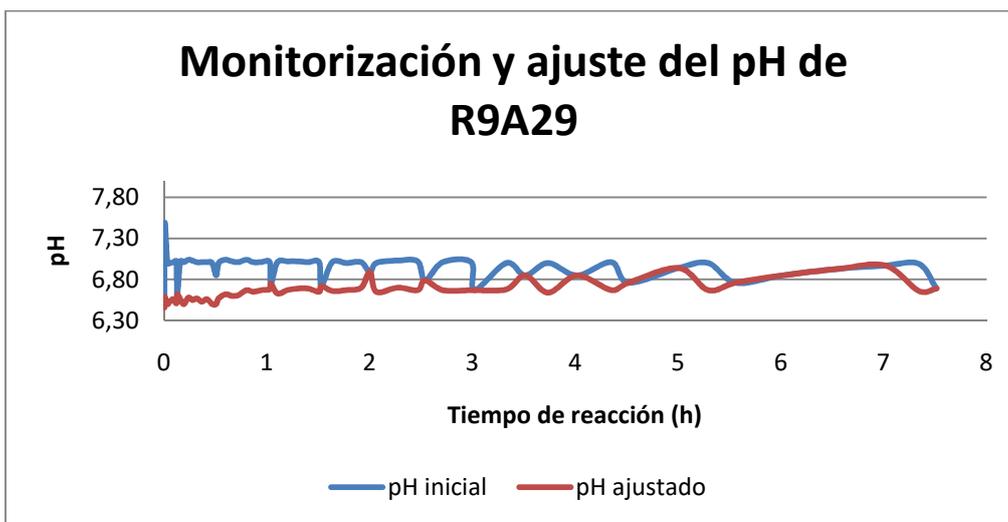


Imagen 67. Evolución del pH en medio ajustado entre 6,6 y 7,0

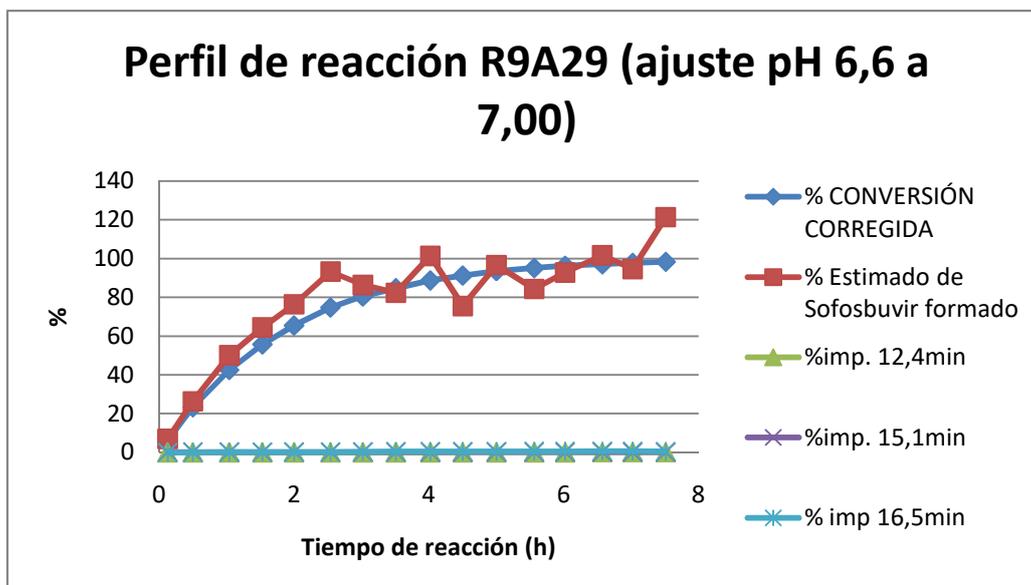


Imagen 68. Evolución de la reacción con el ajuste de pH entre 6,6 y 7, 0 aproximadamente, comparando valores de conversión (%) y sofosbuvir formado (%)⁴², así como porcentaje de área de HPLC para las tres impurezas, en porcentajes inferiores a 0,67%

⁴⁰ pH de la mezcla de reacción una vez añadido el intermedio 3.2

⁴¹ Ver nota 40

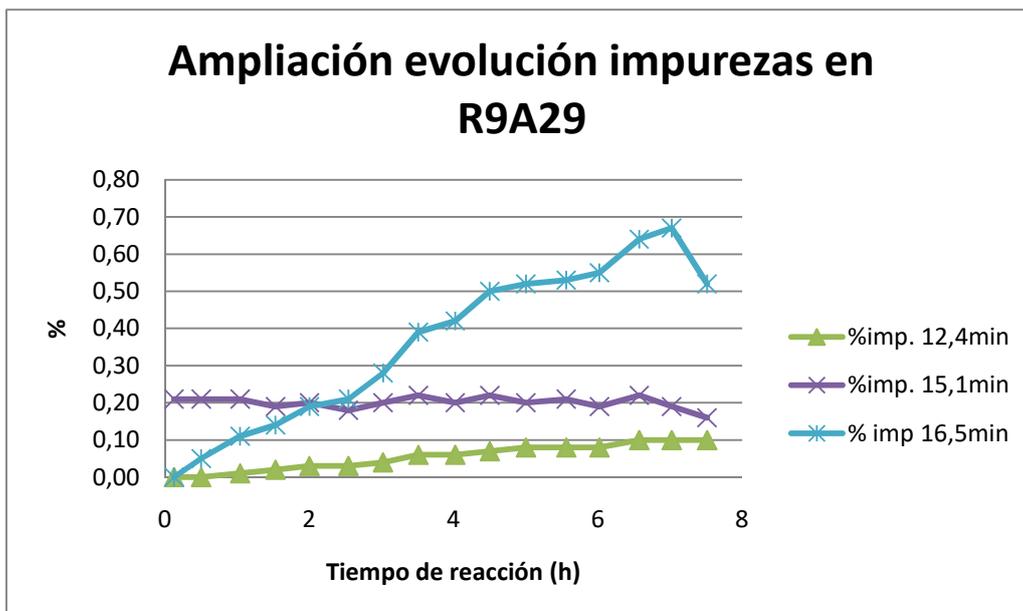


Imagen 69. Ampliación de la proporción y evolución de las principales impurezas en función del progreso de la reacción

Tabla 64. Controles e impurezas de la R9A29 con monitorización y ajuste de pH entre 6,6 y 7,0

Código Reacción	Control reacción	Tiempo (h)	Impureza 1 (%) tr=12,4min	Impureza 2 (%) tr=15,1min	Impureza 3 (%) tr=16,5min
R9A29 (ajuste pH 6,60-7,00)	C1	0,13	0	0,21	0
	C2	0,5	0	0,21	0,05
	C3	1,0	0,01	0,21	0,11
	C4	1,5	0,02	0,19	0,14
	C5	2,0	0,03	0,2	0,19
	C6	2,5	0,03	0,18	0,21
	C7	3,0	0,04	0,2	0,28
	C8	3,5	0,06	0,22	0,39
	C9	4,02	0,06	0,2	0,42
	C10	4,5	0,07	0,22	0,5
	C11	5,0	0,08	0,2	0,52
	C12	5,6	0,08	0,21	0,53
	C13	6,0	0,08	0,19	0,55
	C14	6,6	0,1	0,22	0,64
	C15	7,0	0,1	0,19	0,67
	C16	7,5	0,1	0,16	0,52

⁴² Puesto que la reacción es una suspensión, la toma de muestra en algunos puntos puede no ser homogénea y ocasionar algunos valores anómalos, tal como el observado aproximadamente a 7,5 h de reacción

2. Ajuste a valores $6,35 < \text{pH} < 6,55$:

El experimento se realizó del mismo modo que los anteriores, obteniendo los siguientes resultados:

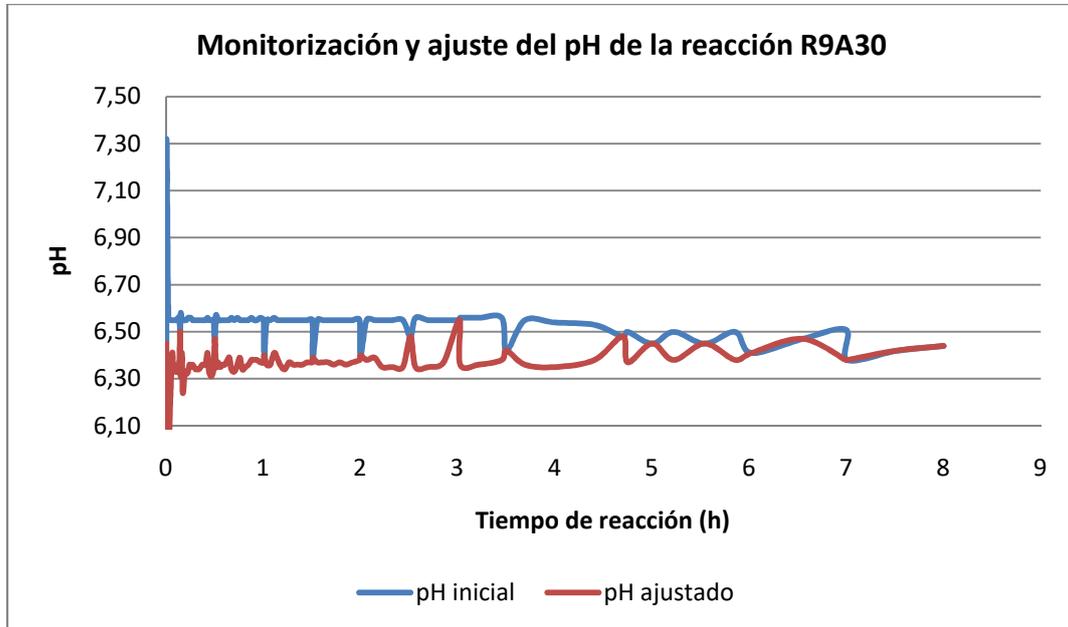


Imagen 70. Evolución del pH en medio ajustado entre 6,35 y 6,55

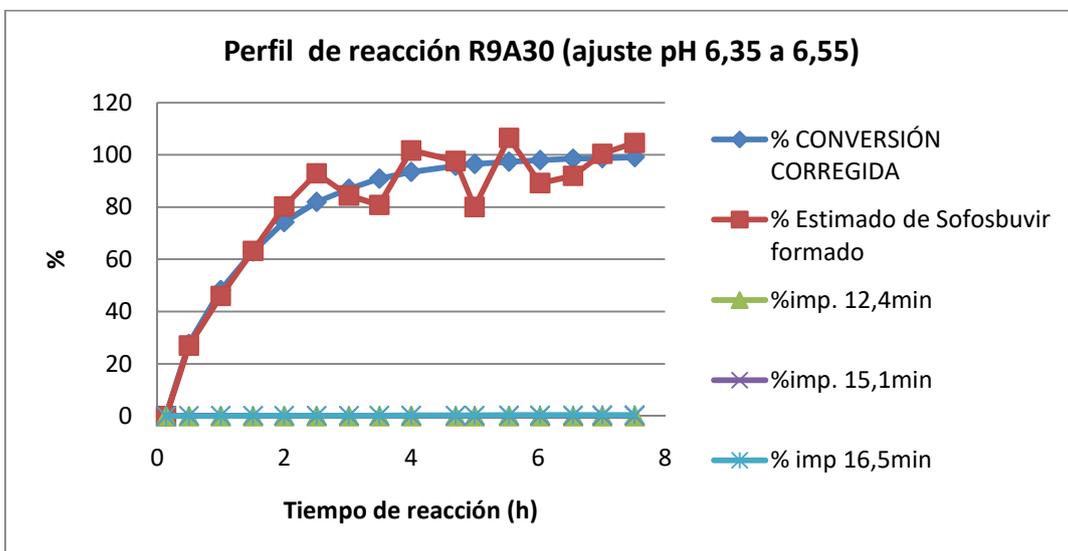


Imagen 71. Evolución de la reacción con el ajuste de pH entre 6,35 y 6,55 aproximadamente, comparando valores de conversión (%) y Sofosbuvir formado (%)⁴³, así como el porcentaje de área de HPLC para las tres impurezas, en porcentajes inferiores a 0,5%

⁴³ Puesto que la reacción es una suspensión, la toma de muestra en algunos puntos puede no ser homogénea y ocasionar algunos valores anómalos

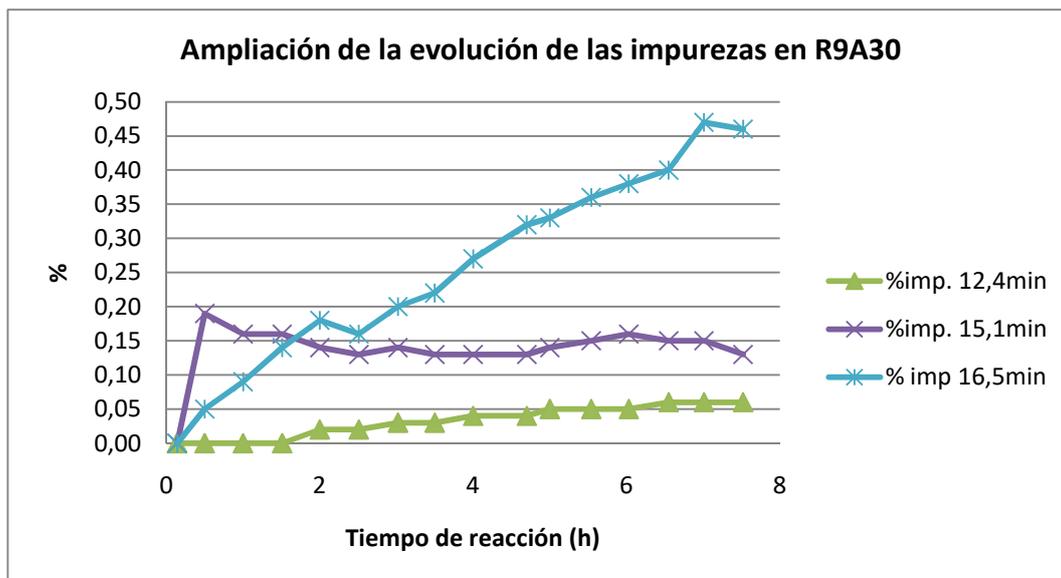


Imagen 72. Ampliación de la proporción y evolución de las principales impurezas en función del progreso de la reacción

Tabla 65. Controles e impurezas de la R9A30 con monitorización y ajuste de pH entre 6,35 y 6,55

Código Reacción	Control reacción	Tiempo (h)	Impureza 1 (%) tr=12,4min	Impureza 2 (%) tr= 15,1min	Impureza 3 (%) tr= 16,5min
R9A30 (ajuste pH 6,35-6,55)	C1	0,14	0,00	0,00	0,00
	C2	0,50	0,00	0,19	0,05
	C3	1,00	0,00	0,16	0,09
	C4	1,50	0,00	0,16	0,14
	C5	2,00	0,02	0,14	0,18
	C6	2,50	0,02	0,13	0,16
	C7	3,00	0,03	0,14	0,20
	C8	3,50	0,03	0,13	0,22
	C9	4,00	0,04	0,13	0,27
	C10	4,70	0,04	0,13	0,32
	C11	5,00	0,05	0,14	0,33
	C12	5,50	0,05	0,15	0,36
	C13	6,00	0,05	0,16	0,38
	C14	6,60	0,06	0,15	0,40
	C15	7,00	0,06	0,15	0,47
	C16	7,50	0,06	0,13	0,46
	C17	8,00	0,05	0,09	0,40

9.4.3. Resumen de los ensayos comparativos del estudio de pH

De acuerdo con la hipótesis formulada en relación al posible origen y formación de las impurezas del proceso, el ajuste del pH en el medio de reacción permitió reducir el porcentaje de impurezas en el crudo de reacción hasta porcentajes aceptables, considerablemente bajos

teniendo en cuenta que el enzima se encontraba en forma de extracto celular parcialmente clarificado. El ajuste de pH más favorable se determinó entre 6,35 y 6,55.

Tabla 66. Resumen de los pH monitorizados durante las reacciones R9A23, R9A24, R9A29 y R9A30 con los porcentajes correspondientes de las tres impurezas de proceso a estudio

Código Reacción	Ajuste de pH	Tiempo (h)	Impureza 1 (%) tr=12,4min	Impureza 2 (%) tr= 15,1min	Impureza 3 (%) tr= 16,5min
R9A23	No (6,60-8,42)	8.00	2,87	3,11	15,19
R9A24	Sí (7,20-7,50)	7,50	0,29	0,43	1,65
R9A29	Sí (6,60-7,00)	7,50	0,10	0,16	0,52
R9A30	Sí (6,35-6,55)	8,00	0,05	0,09	0,40

La disminución del pH del medio no afecta a la evolución de la conversión a sofosbuvir, tal y como se muestra en la Imagen 73.

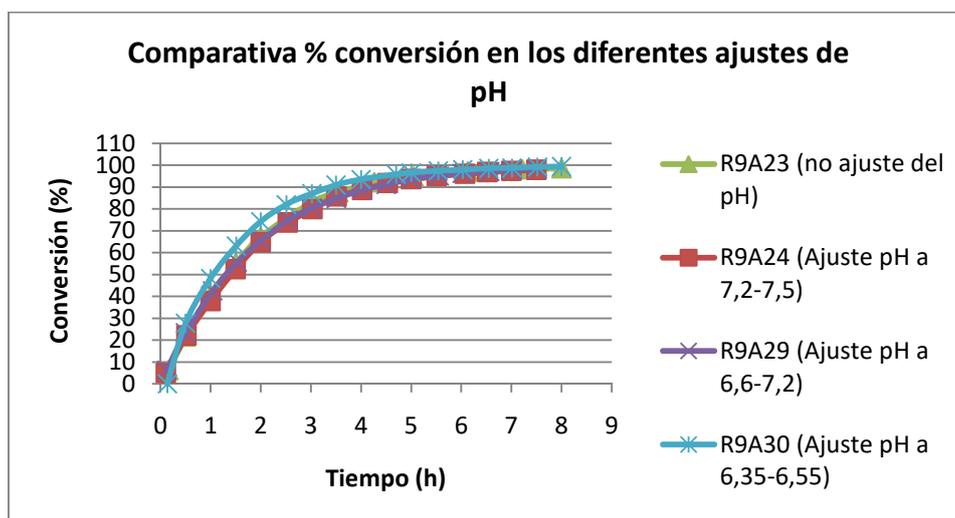


Imagen 73. Evolución de la conversión en los diferentes ensayos de ajuste de pH

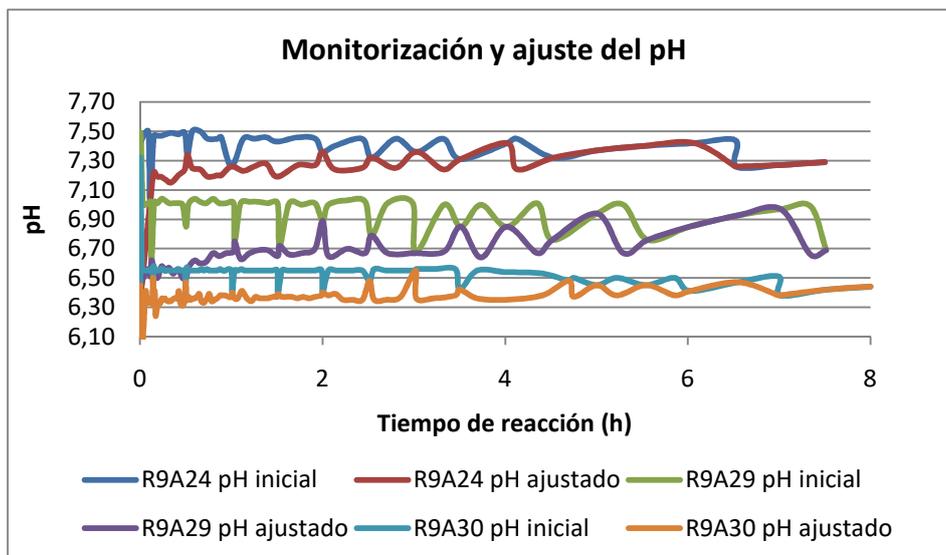


Imagen 74. Rango de ajuste de pH de los diferentes ensayos realizados

9.5. Estudio combinado del efecto agua como medio de reacción y estequiometría enzima/sustrato (II)

Con el fin de intentar optimizar el uso de catalizador, se procedió a estudiar la relación estequiométrica entre enzima y sustrato a niveles inferiores a 2 equivalentes, el cual había sido el mejor resultado obtenido en el estudio previo de dicha relación tal y como se ha descrito anteriormente.

Partiendo de la estequiometría intermedia y de referencia en R9A15 (1 equivalente), se realizó una batería de experimentos, en agua, a 45°C y saturación de sustrato (23 g/l producto de partida), variando el número de equivalentes de enzima y en uno de ellos con adición sucesiva de enzima a un punto durante el transcurso de la reacción (experimento R9A26):

Tabla 67. Equivalentes de enzima utilizados en las reacciones R9A25 a R9A28.

Experimento	Equivalentes enzima
R9A25	0,5
R9A26	0,5+0,5
R9A27	1
R9A28	2

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

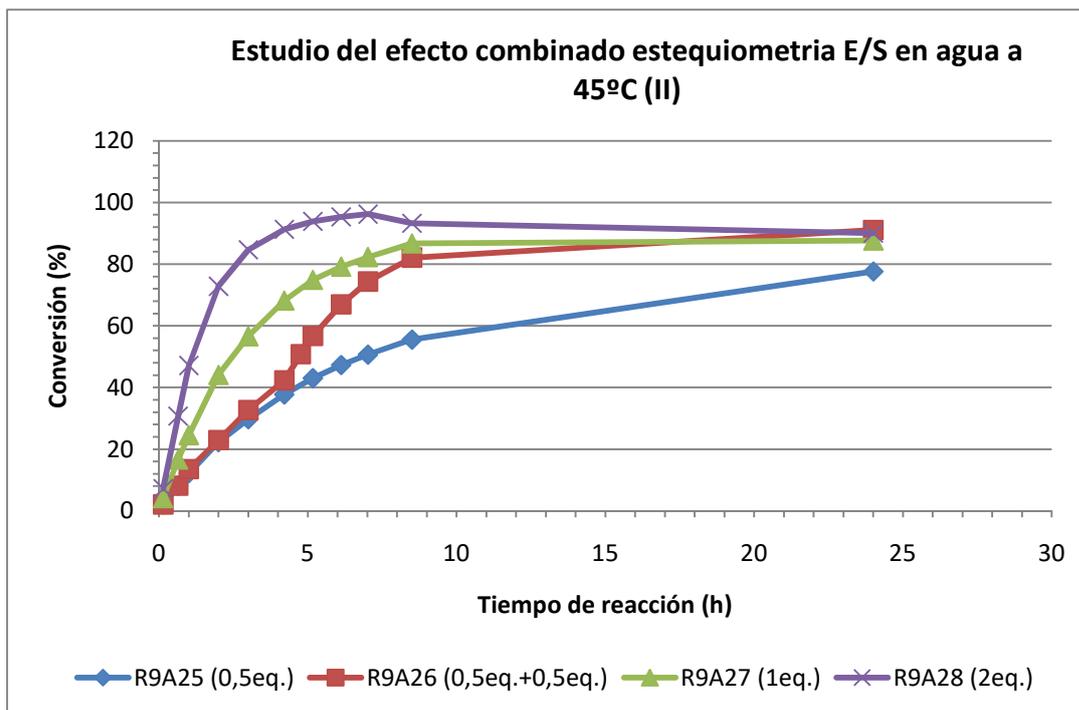


Imagen 75. Evolución de la conversión de los cuatro experimentos realizados en el estudio combinado del efecto agua como medio de reacción y estequiometría enzima/sustrato (II) a 45°C

Tal y como se observa en los perfiles de reacción mostrados, a mayor cantidad de equivalentes de enzima utilizados se obtiene una mayor conversión a tiempos de reacción más cortos, llegando a alcanzar valores de conversión de alrededor del 90% en el caso de 1 y 2 equivalentes a tiempo 24 horas.

En el caso de la reacción R9A26, inicialmente se utilizaron 0,5 equivalentes de enzima hasta las 4 horas de reacción (los datos de conversión obtenidos son reproducibles con los valores de la reacción R9A25, a igual número de equivalentes). En este punto, cuando a R9A26 se le adicionaron otros 0,5 equivalentes de enzima (véase el cambio de pendiente en R9A26 en la Imagen 75), se llega a alcanzar los resultados de conversión a tiempo final exactamente como R9A27 (que utiliza 1 equivalente de enzima desde el inicio de la reacción).

Como se había observado y descrito anteriormente, a mayor relación estequiométrica, la conversión máxima se alcanza a tiempos más cortos, alrededor de las 5 horas de reacción, siendo un tiempo suficiente para transformar cuantitativamente el producto de partida a producto final. A mayores tiempos de reacción, una menor relación estequiométrica proporciona conversiones cuantitativas, alrededor de las 24 horas de reacción, usando 1 equivalente de enzima, bien sea añadido a tiempo cero o a mitad del proceso.

En esta batería de experimentos, el uso de 0,5 equivalentes de enzima (reacción R9A25) requirió mayores tiempos de reacción para transformar cuantitativamente el producto de partida a producto final.

Por todo ello, se concluyó que la relación estequiométrica óptima enzima/sustrato era 1 equivalente, añadido completamente desde el inicio del proceso.

9.6. Estudio de sobresaturación con ajuste del pH entre 6,35-6,55

En las mejores condiciones de reacción ensayadas hasta la fecha se decidió realizar un último ensayo de sobresaturación del sustrato de partida 3.2 en el medio (sobresaturación 200%, ver condiciones de reacción en la tabla resumen del Anexo 1), ajustando el pH entre 6,35 y 6,55.

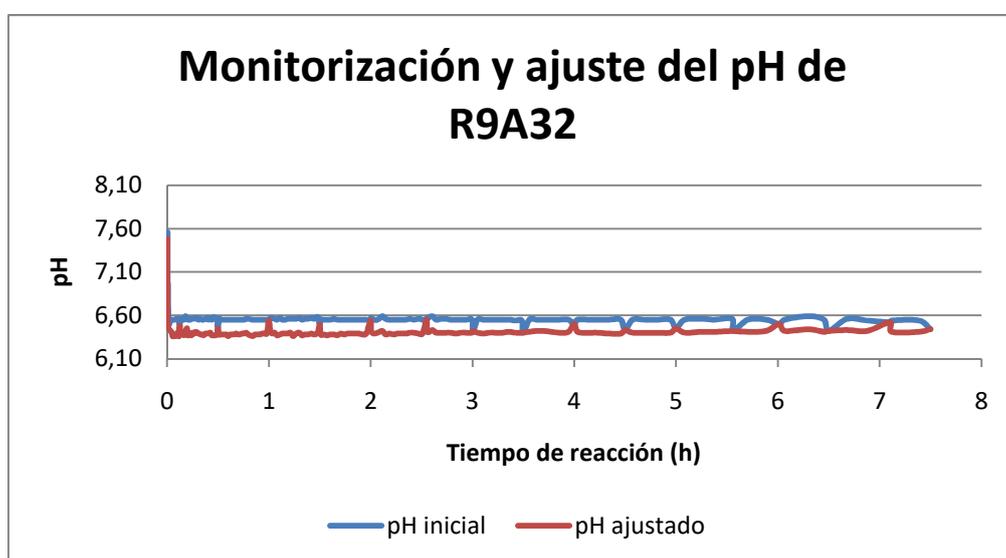


Imagen 76. Evolución del pH en medio ajustado entre 6,35 y 6,55

La naturaleza física de la mezcla de reacción era cambiante a lo largo del tiempo, siendo a tiempo inicial un sólido dispersado y sólido transparente adherido a las paredes del balón el cual se iba transformando en una suspensión blanquecina de sólido fino y un sólido aglomerado en movimiento, que se iba disgregando a medida que transcurre la reacción.

A las 2 horas del inicio de la reacción se observaba como la suspensión blanquecina se aclaraba y se obtenía una agrupación del sólido blanco formado que se iba adhiriendo al fondo y paredes del balón de reacción, e incluso en las paredes del electrodo, observándose mayor dificultad de ajuste del pH a mayor tiempo de reacción.

Esta suspensión cambiante dificultaba especialmente en este experimento la toma de muestra homogénea y representativa del crudo de reacción. Este efecto se observa claramente cuando

se representan los valores de conversión y formación de sofosbuvir en los distintos controles del proceso (ver Imagen 77).

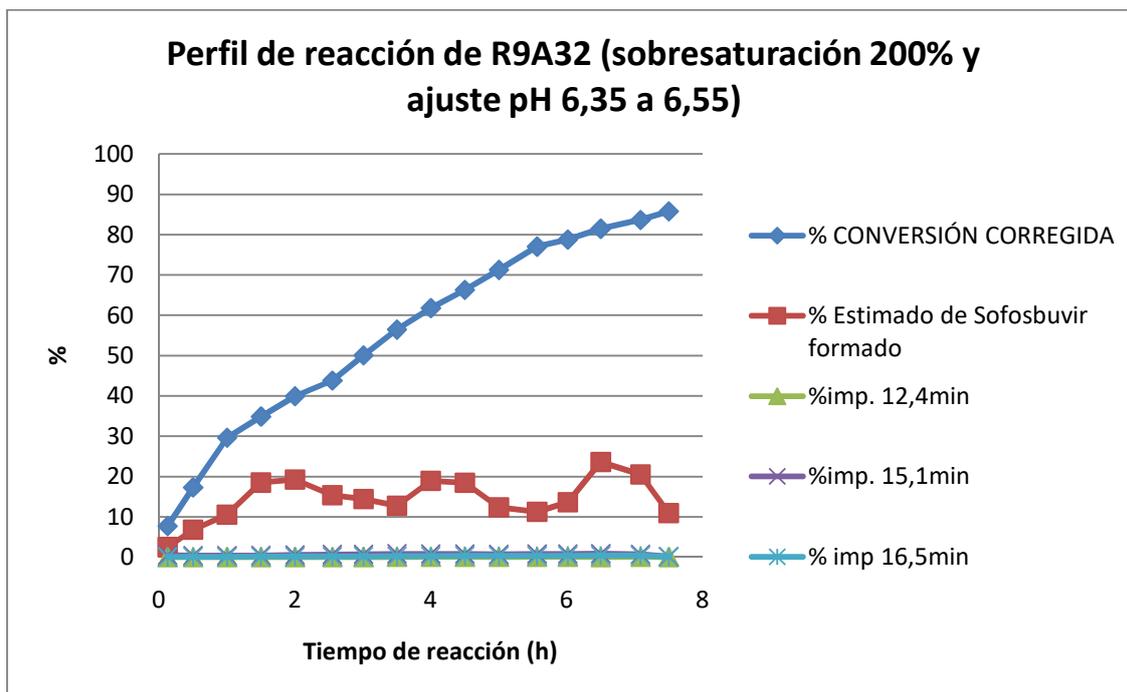


Imagen 77. Evolución de la reacción con el ajuste de pH entre 6,35y 6,55 aproximadamente, comparando valores de conversión (%) y sofosbuvir formado (%) según bases de cálculo, así como porcentaje de área de HPLC para las tres impurezas, en porcentajes inferiores a 0,9%

En este caso, puesto que la reacción era una suspensión y existía sólido aglomerado en movimiento por la sobresaturación del medio, la toma de muestra para los controles fue de la parte soluble y suspensión de sólido fino pero no del sólido aglomerado depositado en el fondo del reactor. Por ese motivo, el porcentaje obtenido para sofosbuvir formado no supera el 25%, valor infraestimado respecto del real, como se demuestra a continuación.

Para corregir esta desviación y disponer del valor real de porcentaje de sofosbuvir formado, el crudo de reacción se llevó a sequedad, obteniendo 7,8 g⁴⁴, y se analizó una alícuota homogénea del crudo seco.

El análisis por HPLC y el cálculo de valores de conversión (%) y sofosbuvir formado (%), según bases de cálculo descritas, muestran que aún existía producto de partida sin reaccionar (valor de conversión: 74% y valor de sofosbuvir formado: 81%).

⁴⁴ El peso esperado de sofosbuvir eran 7,07 gramos si la conversión era cuantitativa, pero a esta masa debe sumarse la contribución de las sales de neutralización, los restos de enzima y las impurezas.

Es relevante que en este caso la impureza mayoritaria fuera la que eluye a 15,1 minutos (Impureza 2). El hecho que en este ensayo la impureza 2 tenga mayor porcentaje sobre las otras dos impurezas se puede atribuir a la mayor cantidad inicial de sustrato en el medio, y al hecho que a su vez presenta una evolución de la conversión a sofosbuvir más lenta, dada la poca homogeneidad dentro de la heterogeneidad de la reacción.

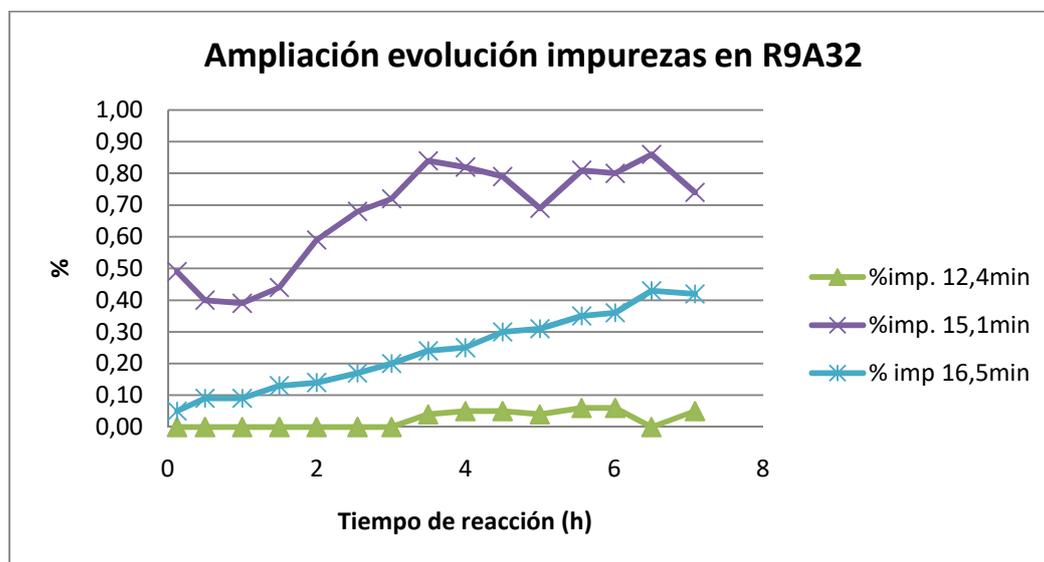


Imagen 78. Ampliación de la proporción y evolución de las principales impurezas en función del progreso de la reacción

Tabla 68. Controles e impurezas de R9A32, reacción a sobresaturación de sustrato y control de pH.

Código Reacción	CONTROL REACCIÓN	Tiempo (h)	Impureza 1 (%) tr=12,4min	Impureza 2 (%) tr= 15,1min	Impureza 3 (%) tr= 16,5min
R9A32 (ajuste pH 6,35-6,55)	C1	0,13	0	0,53	0,05
	C2	0,50	0	0,49	0,05
	C3	1,00	0	0,4	0,09
	C4	1,50	0	0,39	0,09
	C5	2,00	0	0,44	0,13
	C6	2,55	0	0,59	0,14
	C7	3,01	0	0,68	0,17
	C8	3,50	0	0,72	0,2
	C9	4,00	0,04	0,84	0,24
	C10	4,50	0,05	0,82	0,25
	C11	5,00	0,05	0,79	0,3
	C12	5,56	0,04	0,69	0,31
	C13	6,01	0,06	0,81	0,35
	C14	6,50	0,06	0,8	0,36
	C15	7,09	0	0,86	0,43
	C16	7,50	0,05	0,74	0,42

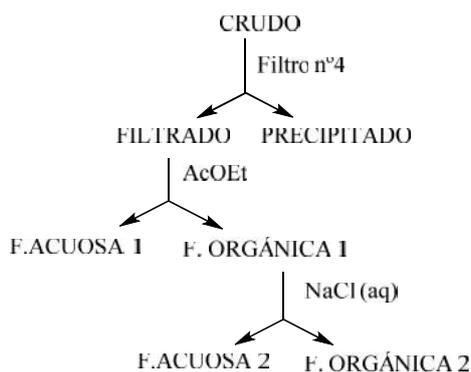
10. Estudio preliminar de purificación del crudo

Paralelamente, se inició un estudio preliminar de purificación de un crudo de reacción; en concreto, de un crudo donde se había controlado la variación de pH para disminuir la formación de impurezas.⁴⁵

Se decidió trabajar con una alícuota del crudo total (ver Esquema 1).⁴⁶ Inicialmente, se observaba un sólido fino que se filtraba a través de una placa fritada⁴⁷ (el sólido obtenido se denomina, en adelante, "PRECIPITADO"). El filtrado (en adelante, "FILTRADO"), era ligeramente turbio, puesto que parte del sólido había pasado a través del filtro.

Sobre el FILTRADO se llevó a cabo una extracción con AcOEt (durante este proceso se generó mucha interfase). En este caso, la fase acuosa ("F.ACUOSA 1"), era completamente transparente.

La interfase se agrupó con la F.ORGÁNICA 1, y el conjunto se lavó con una solución acuosa saturada de NaCl, generándose "F.ORGÁNICA 2" y "F.ACUOSA 2".



Esquema 1. Proceso de work-up en la obtención de sofosbuvir

Todas estas fracciones se analizaron por HPLC, los resultados se muestran en la siguiente figura.

⁴⁵ Crudo de reacción R9A24, donde se obtuvo una conversión del 97,9 % y el % total de las tres impurezas fue de 2,4%

⁴⁶ A parte del sólido fino, en el balón de reacción también había un sólido pastoso, que se quedó adherido al imán y al fondo del balón. Se disolvió en AcOEt y se trasvasó a un vial y se concentró a sequedad (esta fracción se denomina "SÓLIDO")

⁴⁷ El tamaño de poro del fritado que se usó es de 16 a 40 micras, por lo que el sólido obtenido tenía un tamaño de partícula inferior

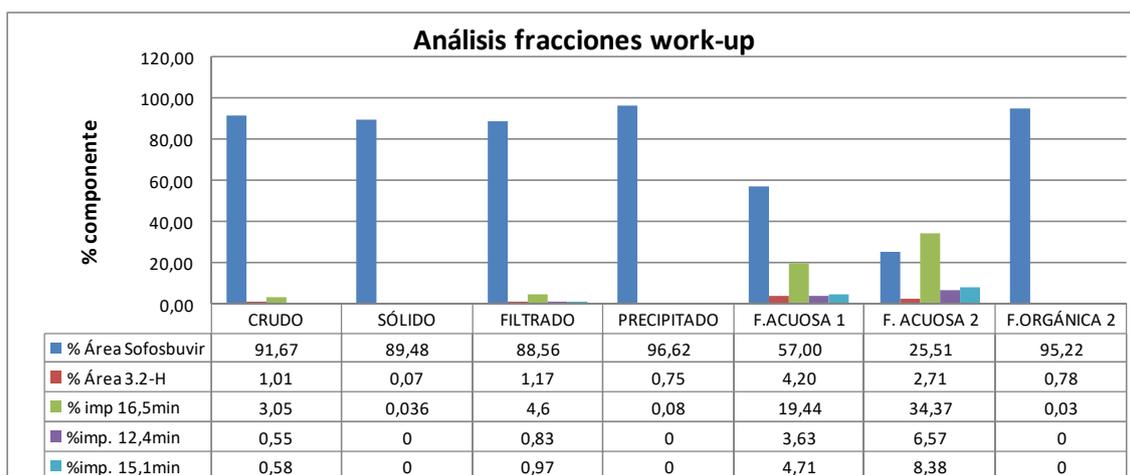


Imagen 79. Análisis del contenido de las fracciones generadas durante el ensayo de work-up

Los resultados obtenidos se resumen de la siguiente manera::

- El sólido que quedó unido al fondo del balón como sólido pastoso (SÓLIDO), corresponde mayoritariamente a sofobuvir. Se observa un 1% adicional que corresponde al intermedio 3.2 sin reaccionar y a la impureza 3 ($t_R = 16,5$ min), que se generó a partir de sofobuvir.
- El PRECIPITADO tiene prácticamente la misma composición que el SÓLIDO, mientras que en el FILTRADO se encuentran un porcentaje superior del Intermedio 3.2. (hecho que corresponde a la mayor solubilidad de éste frente a sofobuvir) y también se encuentran las impureza 2 ($t_R = 15,1$ min), que es la que se genera a partir del intermedio 3.2. Por otro lado, también se encuentra la impureza 1 ($t_R = 12,4$ min), que provendría del sofobuvir, cuya solubilidad en H_2O es mayor a la de sofobuvir y la impureza 3.
- Cuando se llevaron a cabo las extracciones, se observó que en la fase orgánica (F.ORGÁNICA 2) hay mayoritariamente sofobuvir y el porcentaje de intermedio 3.2 y de la impureza 3 es muy similar al del precipitado.

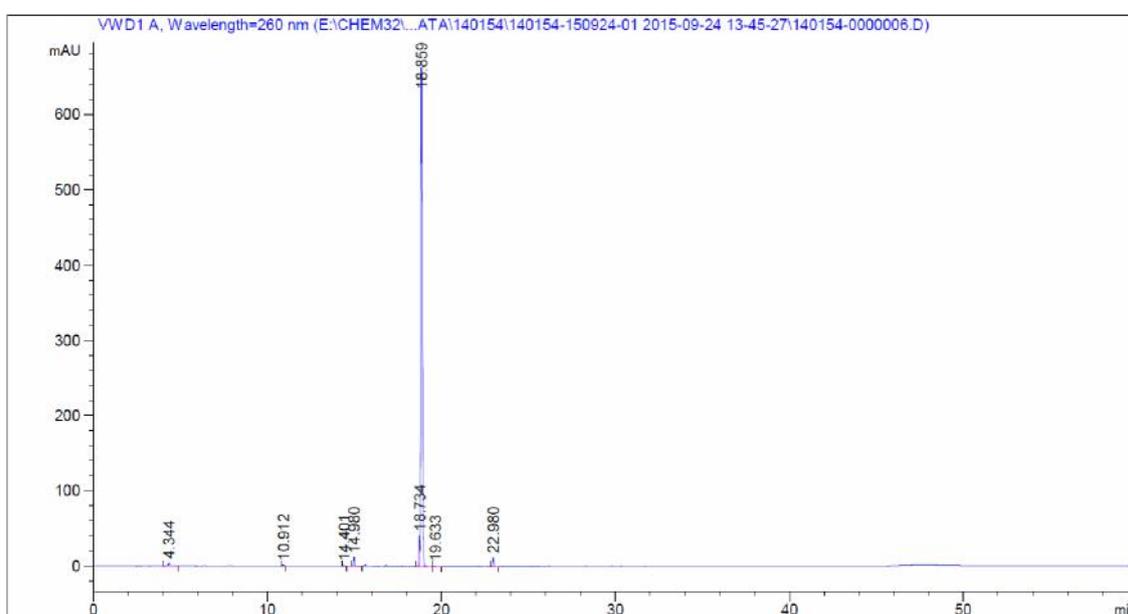
El principal resultado obtenido de este ensayo es que el sofobuvir es más soluble en fase orgánica que en fase acuosa y de ahí que en la F.ACUOSA 1 el porcentaje sea del 57% y que posteriormente en el lavado con *brine*⁴⁸, el porcentaje disminuya al 26%.

⁴⁸ Solución sobresaturada de NaCl

A pesar de ser un ensayo preliminar, se consiguió disminuir el porcentaje de impurezas que desde el crudo de reacción van hacia la fase orgánica, por lo que la pureza de sofosbuvir extraído era superior.

11. Verificación sobre intermedio de ruta no infrigente

La tarea final que completó esta fase del estudio consistió en la verificación de los resultados del trabajo de optimización realizado sobre el intermedio 3.2 obtenido según la ruta del originador al intermedio 3.2 obtenido a través de la ruta alternativa, no infrigente de patente. Este último compuesto contenía aproximadamente un 4,23% del diastereómero R como principal impureza (ver Imagen 80).



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.344	BB	0.0864	25.64952	4.43190	0.6180
2	10.912	BB	0.0745	9.54181	2.00397	0.2299
3	14.401	BB	0.0664	5.15819	1.23054	0.1243
4	14.980	BB	0.0672	52.38268	12.27797	1.2620
5	18.734	BV E	0.0615	161.36075	41.40578	3.8876
6	18.859	VV R	0.0892	3834.58228	664.07440	92.3856
7	19.633	VB	0.0816	5.20007	9.46604e-1	0.1253
8	22.980	BB	0.0731	56.75370	12.22237	1.3674

Imagen 80. Cromatograma del intermedio 3.2 obtenido a través de la ruta no infrigente

El objetivo de este estudio preliminar consistió en determinar la estereoselectividad del enzima respecto a ambos sustratos, para verificar su capacidad de biotransformar dicha impureza diastereomérica a (R)-sofosbuvir, también denominado Impureza I.

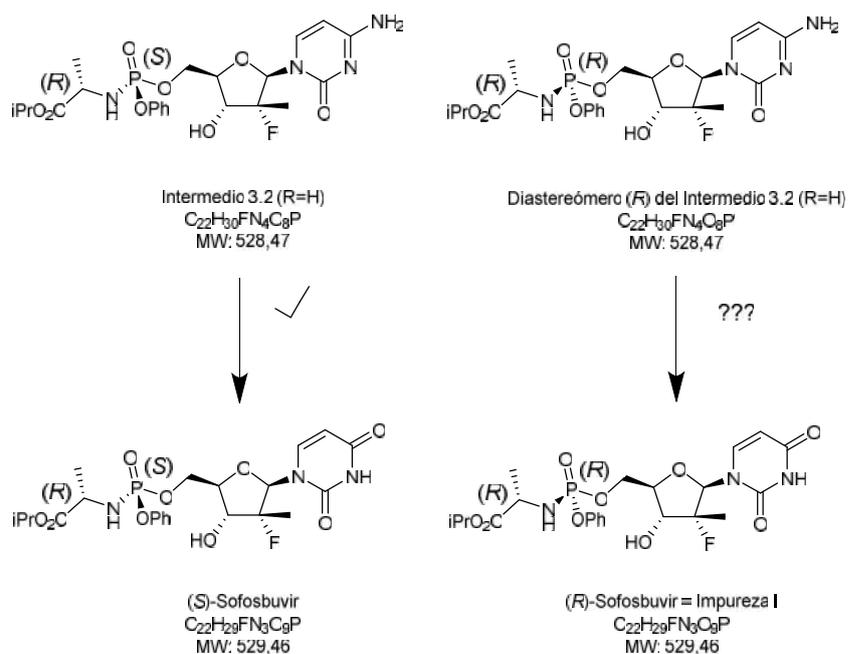


Imagen 81. Sustratos y productos finales del ensayo de estereoselectividad del enzima

Los tiempos de elución para estos cuatro compuestos analizados se describen en la siguiente tabla:

Tabla 69. RT i RRT obtenidos para los 4 compuestos analizados.

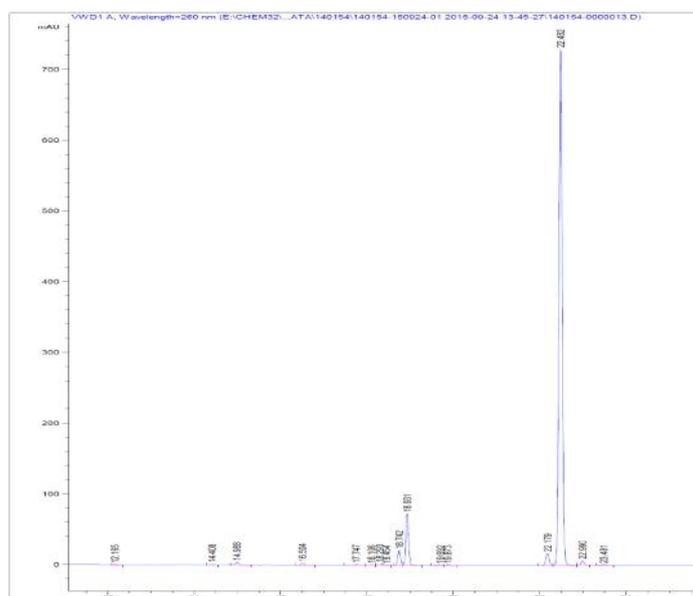
Compuesto	Tiempo de retención (min) ⁴⁹	RRT (vs (S)-sofosbuvir)
(R)-Intermedio 3.2 (R=H)	18,73	0,83
(S)-Intermedio 3.2 (R=H)	18,86	0,84
(R)-Sofosbuvir (Impureza I)	22,18	0,98
(S)-Sofosbuvir (Producto deseado)	22,48	1,00

Las condiciones de reacción en las que se realizó este experimento se corresponden a las del ensayo R9A27 en condiciones de saturación del producto de partida en agua a 45°C y 1 equivalente de enzima, y ajustando el pH del medio entre 6,35 y 6,55 como el ensayo R9A30,

⁴⁹ Los tiempos de retención son ligeramente diferentes a los mostrados en apartado de materiales y métodos debido al análisis en diferentes equipos HPLC pero el RRT se mantiene respecto sofosbuvir.

por ser las que hasta la fecha habían permitido una mayor transformación y productividad (ver detalles en tabla experimental en el Anexo 1, Imagen 83 y Imagen 84).

A continuación se muestra un cromatograma ejemplo, a tiempo final, del experimento realizado:



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.167	VV	0.1850	7.13062	4.88086e-1	0.1586
2	4.101	VB	0.0614	4.30790	9.80785e-1	0.0958
3	4.243	BB	0.0826	2.17577	3.98370e-1	0.0484
4	7.760	BB	0.1500	5.96192	6.04640e-1	0.1326
5	8.901	BD	0.1718	39.14053	3.43397	0.8483
6	10.870	BR	0.0836	1.46884	2.71054e-1	0.0327
7	12.165	BB	0.0673	1.91276	4.48074e-1	0.0425
8	14.408	BB	0.0665	5.83973	1.38951	0.1299
9	14.988	BD	0.0673	18.55340	4.34498	0.4127
10	16.504	BV	0.0795	13.89463	2.74072	0.3091
11	17.747	BV R	0.0773	6.01359	1.17205	0.1338
12	18.106	BB	0.0729	2.33198	5.04501e-1	0.0519
13	18.293	BV R	0.0755	7.99521	1.64895	0.1778
14	18.454	VB E	0.0777	8.01149e-1	1.55148e-1	0.0178
15	18.742	BV	0.0697	93.80040	20.95210	2.0864
16	18.931	VB	0.0683	317.53879	72.88754	7.0628
17	19.692	BV	0.0958	2.73767	4.23629e-1	0.0609
18	19.873	VB	0.0798	3.75589	7.37173e-1	0.0835
19	22.179	BV	0.0820	87.65907	16.60503	1.9493
20	22.482	VV	0.0814	3818.40552	729.96399	84.9307
21	22.990	VB	0.0730	29.59238	6.38520	0.6582
22	23.481	BB	0.0892	4.13367	7.00331e-1	0.0919
23	28.303	BB	0.1322	8.79214	9.81636e-1	0.1956
24	29.343	BV	0.1511	7.54084	7.21393e-1	0.1677
25	30.353	VB	0.1488	5.42003	5.15614e-1	0.1206

Imagen 82. Ampliación del cromatograma del control de reacción de R9A31 a 7,5 h

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

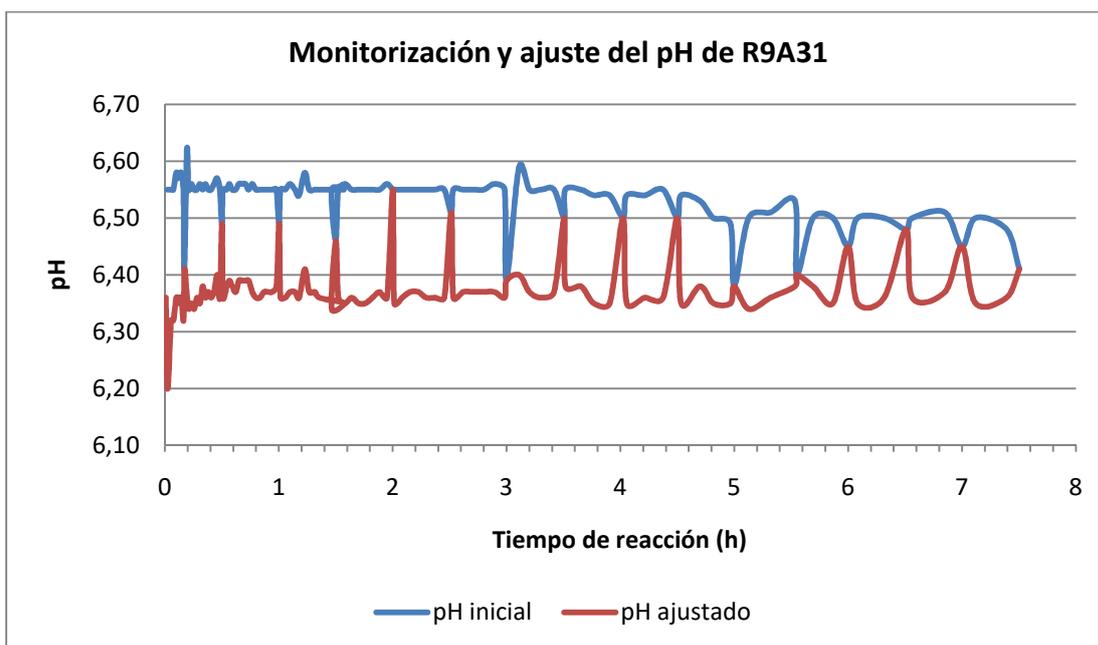


Imagen 83. Evolución del pH en medio ajustado entre 6,35 y 6,55 en la reacción R9A31

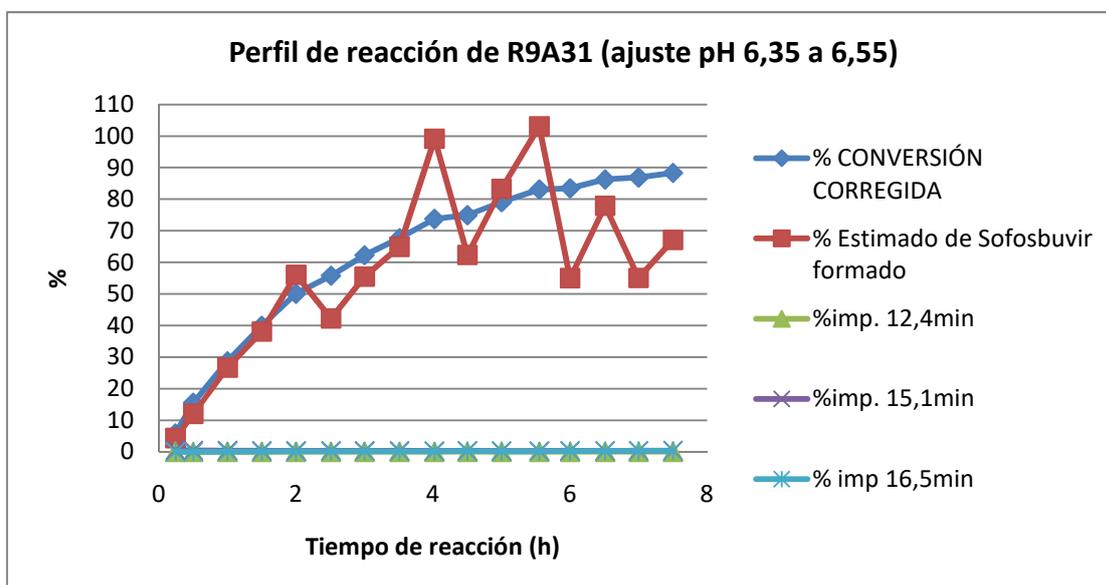


Imagen 84. Evolución de la reacción con el ajuste de pH entre 6,35y 6,55 aproximadamente, comparando valores de conversión (%) y sofosbuvir formado (%)⁵⁰, así como porcentaje de área de HPLC para las tres impurezas, en porcentajes inferiores a 0,5%

⁵⁰ Puesto que la reacción es una suspensión, la toma de muestra en algunos puntos pudo no ser homogénea y ocasionar algunos valores anómalos

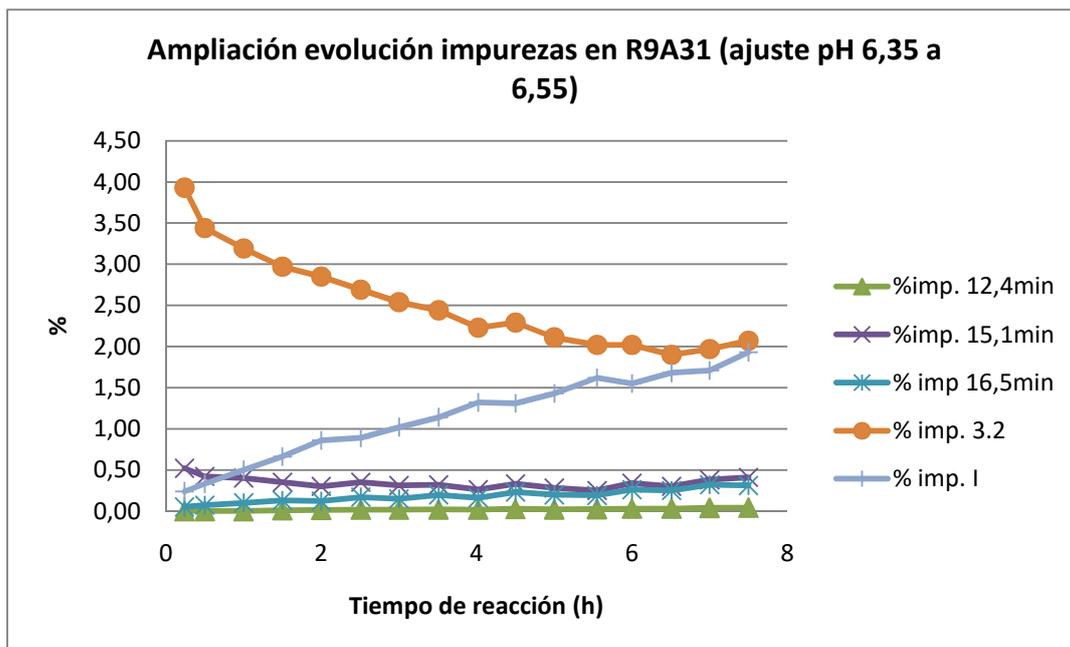


Imagen 85. Ampliación de la proporción y evolución de las principales impurezas en función del progreso de la reacción

Tabla 70. Tabla de controles e impurezas de estudio de la reacción R9A31

Código Reacción	CONTROL REACCIÓN	Tiempo (h)	Impureza 1 (%) tr=12,4min	Impureza 2 (%) tr= 15,1min	Impureza 3 (%) tr= 16,5min	Impureza 3.2 (%) tr= 18,7min	Impureza I (%) tr= 22,1min
R9A31 (ajuste pH 6,35-6,55)	C1	0,24	0	0,52	0,05	3,93	0,24
	C2	0,50	0	0,42	0,07	3,44	0,33
	C3	1	0	0,4	0,1	3,19	0,5
	C4	1,5	0,01	0,35	0,13	2,97	0,66
	C5	2	0,015	0,3	0,12	2,85	0,86
	C6	2,51	0,018	0,35	0,17	2,69	0,89
	C7	3	0,018	0,31	0,15	2,54	1,02
	C8	3,51	0,02	0,32	0,197	2,44	1,14
	C9	4,02	0,018	0,26	0,16	2,23	1,32
	C10	4,5	0,027	0,33	0,23	2,29	1,31
	C11	5	0,02	0,28	0,198	2,11	1,43
	C12	5,55	0,024	0,25	0,19	2,02	1,62
	C13	6	0,03	0,34	0,26	2,02	1,55
	C14	6,51	0,03	0,3	0,25	1,9	1,68
	C15	7	0,04	0,38	0,32	1,97	1,71
	C16	7,5	0,042	0,41	0,31	2,07	1,93

El cálculo de la conversión a Impureza I se realiza según la siguiente fórmula:

Fórmula 1. Cálculo de la conversión a Impureza I.

$$\text{Conversión}(\%) \times \frac{\text{Área}(\text{imp.I}) * 0,65}{(\text{Área}(\text{imp.I}) * 0,65) \Gamma \text{Área}(\text{impureza ZInt.3.2})} * 100$$

Se tiene en cuenta los factores respuesta de sofosbuvir e Intermedio 3.2 para el cálculo, ya que no se disponía de patrón de la impureza del diastereoisómero (R) del intermedio 3.2, y en el caso de la Impureza I se comprobó que su FR es muy similar al obtenido con el patrón sofosbuvir.

En la Tabla 71 se muestra el porcentaje de conversión a Impureza I así calculado:

Tabla 71. Valores obtenidos de Impureza I en los diferentes controles de R9A31.

Código Reacción	CONTROL REACCIÓN	Tiempo (h)	Conversión a Impureza I (%)
R9A31 (ajuste pH 6,35-6,55)	C1	0,24	3,7
	C2	0,50	5,7
	C3	1	9,0
	C4	1,5	12,2
	C5	2	16,0
	C6	2,51	17,3
	C7	3	20,2
	C8	3,51	22,7
	C9	4,02	27,3
	C10	4,5	26,6
	C11	5	30,0
	C12	5,55	33,6
	C13	6	32,6
	C14	6,51	35,8
	C15	7	35,4
	C16	7,5	37,1

Se observa que a medida que avanza la reacción, la Impureza I iba aumentando su porcentaje de área en el medio y la impureza del intermedio 3.2, disminuía a su vez. Cabe remarcar que la conversión a impureza I ((R)-sofosbuvir) no es tan rápida como a (S)-sofosbuvir en esta misma reacción, por lo que se puede afirmar que, a pesar de no ser estereoespecífico, aparentemente el enzima es más selectivo para el isómero (S) que para el (R), al nivel de impureza presente.

12. Tercera fase de optimización de la reacción biocatalítica

12.1. Demostración de la reproducibilidad de resultados con el biocatalizador lote 05-USP12-P01

Dado que esta fase del proyecto requería el uso de un nuevo lote de biocatalizador (enzima lote 05-USP12-P01), y aunque el control de calidad del producto cumplía con las especificaciones, se procedió a evaluar que este nuevo lote de enzima se comportaba de manera equivalente en la reacción, rindiendo los mismos resultados, y por tanto, demostrando su reproducibilidad.

Así, se realizó un experimento preliminar réplica del experimento R9A32 ya descrito, donde la variable introducida era precisamente el lote de biocatalizador utilizado⁵¹.

De nuevo, se utilizó agitación magnética, con ajuste de pH por adición sucesiva de disolución 1M de ácido acético, manteniendo el pH comprendido entre 6,37 y 6,60.

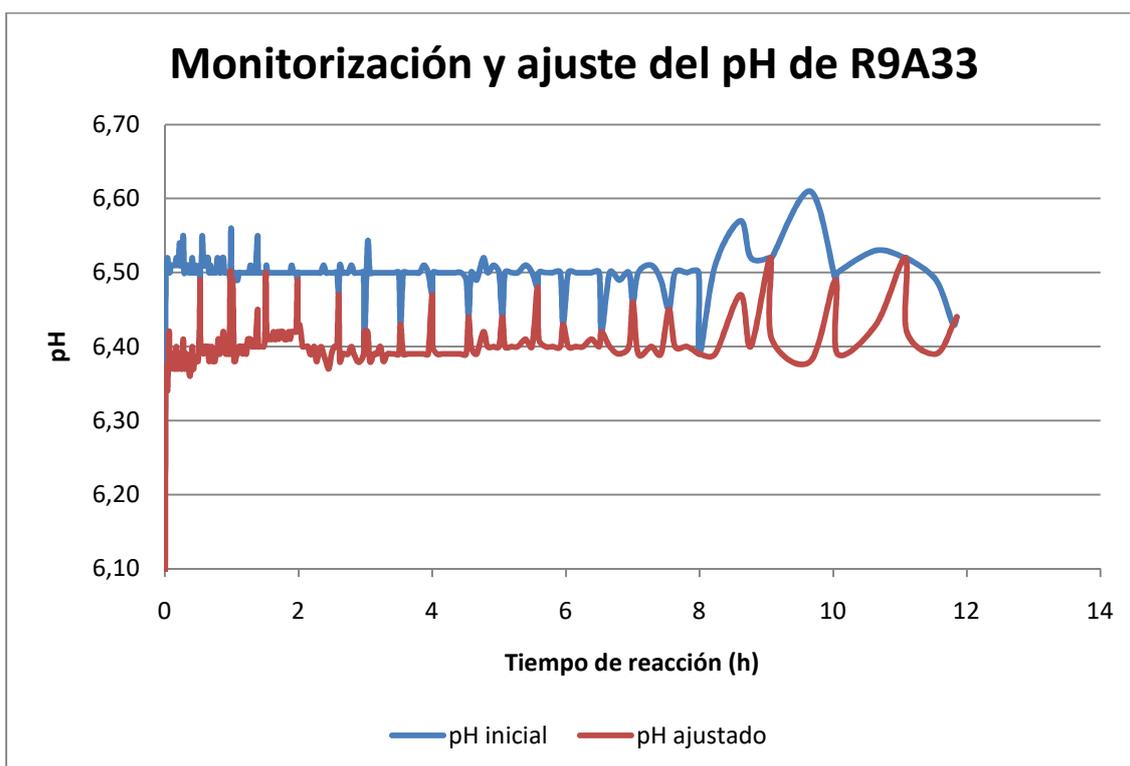


Imagen 86. Evolución del pH en el medio de reacción

⁵¹ Posteriormente, y por una confusión experimental, se observó que la concentración de ambas reacciones era ligeramente diferente. En R9A32 se partía de 167 mM de producto de partida, mientras que en R9A33 fue 133 mM

La reacción se comportó de manera análoga a lo observado en experimentos anteriores, es decir, se trataba de una suspensión heterogénea cambiante a lo largo del tiempo, donde existía un sólido adherido a las paredes del balón y una solución blanquecina fina, que se aglomeraba en grumos.

La reacción se monitorizó durante 12 horas, pasadas las cuales se dejó enfriar a temperatura ambiente.

El perfil cinético de la evolución de la reacción se muestra a continuación, en comparación con el obtenido en la reacción equivalente R9A32:

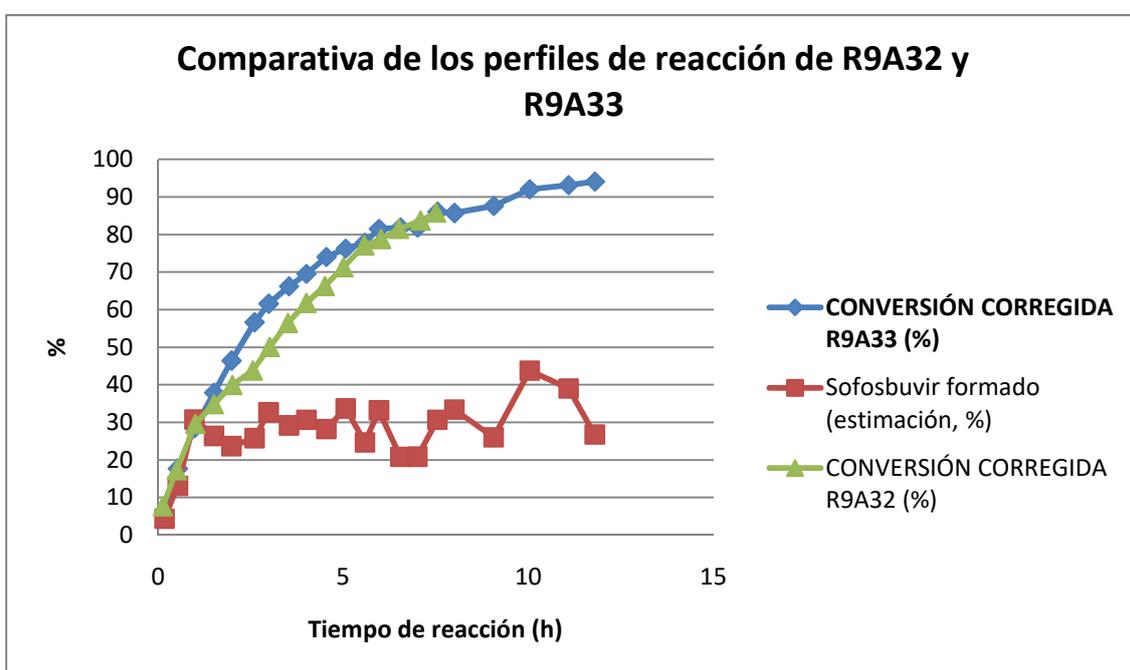


Imagen 87. Evolución de la reacción por comparativa entre resultados obtenidos con el lote de enzima 150417 (en R9A32) respecto del lote de enzima 05-USP-P01 en (R9A33), y representación de sofosbuvir formado en R9A33

A pesar de la ligera diferencia en las concentraciones de sustrato entre ambas reacciones, la comparativa entre sus conversiones muestra como el nuevo lote de enzima 05-USP12-P01 se comportó de manera análoga y reproducible respecto al lote 150417.

De nuevo, la heterogeneidad de la muestra, con gran cantidad de sólido depositado en el fondo del reactor y adherido a las paredes dificultó la toma de muestra⁵² y no refleja exactamente la cantidad de sofosbuvir formado presente en el medio de la reacción.

⁵² Para evitar la obturación de la pipeta muestreadora, la toma de muestra se realizó principalmente del sobrenadante heterogéneo. Esto conllevó que pudiera estar infraestimada la cantidad real de sofosbuvir formado a un determinado valor de tiempo

Tabla 72. Tabla resumen comparativa del porcentaje de sofosbuvir detectado en los controles de las reacciones R9A32 y R9A33

	R9A32				R9A33		
	CONTROL REACCIÓN	HORAS REACCIÓN	% CONVERSIÓN CORREGIDA R9A32		CONTROL REACCIÓN	HORAS REACCIÓN	% CONVERSIÓN CORREGIDA R9A33
	C1	0,13	7,7		C1	0,17	5,4
	C2	0,50	17,3		C2	0,53	17,7
	C3	1,00	29,6		C3	0,98	28,5
	C4	1,50	34,9		C4	1,51	37,9
	C5	2,00	39,9		C5	1,98	46,4
	C6	2,55	43,8		C6	2,60	56,6
	C7	3,01	50,1		C7	2,98	61,6
	C8	3,50	56,5		C8	3,53	66,2
	C9	4,00	61,8		C9	4,00	69,5
	C10	4,50	66,3		C10	4,54	74,0
	C11	5,00	71,3		C11	5,06	76,2
	C12	5,56	77,1		C12	5,58	77,8
	C13	6,01	78,8		C13	5,96	81,5
	C14	6,50	81,5		C14	6,54	81,9
	C15	7,09	83,7		C15	7,00	81,9
	C16	7,50	85,8		C16	7,54	86,0
					C17	8,00	85,7
					C18	9,06	87,6
					C19	10,03	92,0
					C20	11,08	93,2
					C21	11,79	94,1

En base a estos resultados, se consideró demostrado que el uso de un nuevo lote de biocatalizador en esta fase del proyecto no suponía una variable adicional respecto a lo ya desarrollado en fases anteriores, y que el proceso del que se disponía hasta la fecha mostraba buena reproducibilidad.

12.2.Efecto del cambio en el sistema de agitación (de magnética a mecánica)

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar si el cambio de sistema de agitación, de agitación magnética a mecánica, era capaz de mejorar la solubilidad y disminuir la heterogeneidad del medio, evitando que quedaran grumos ocluyendo al producto de partida que dificultaran su transformación a producto final. Adicionalmente, se tuvo en consideración que, llegado el momento de un eventual escalado comercial del proceso, este tipo de agitación era mucho más compatible con los sistemas industriales.

En el experimento R9A34 se mantuvieron las mismas condiciones que en el experimento R9A33 con la única variable del cambio de sistema de agitación, en este caso, agitación mecánica utilizando un agitador de tipo paleta teflonada retráctil a una velocidad de 150 rpm.

Como en los experimentos anteriores, el pH se mantuvo controlado en un intervalo entre 6,35 y 6,50 por adición de sucesivas alícuotas de ácido acético 1 M durante el progreso de la reacción. El volumen total añadido correspondió a 11,64 ml.

El aspecto físico del producto de partida en el medio de reacción fue el de un gran grumo tipo bola conjuntamente con una parte más pegajosa unida a las paredes del matraz. La homogeneidad de la suspensión rápidamente mejoró con la agitación mecánica, a pesar de que la turbidez del sistema aumentó con la adición del biocatalizador.

A medida que progresó el tiempo de reacción se observó la presencia de mucha mayor cantidad de sólido blanco en suspensión pero, a diferencia de lo observado en los experimentos con agitación magnética, en este caso las paletas permitieron una mejor agitación y mantener una gran parte del sólido en suspensión fina, mientras que otra parte del sólido se mantuvo adherido a las paredes del reactor.

La toma de controles de proceso se realizó del mismo modo ya descrito para experimentos anteriores, fundamentalmente del sobrenadante heterogéneo. Aunque se intentó tomar fracción del sólido en suspensión, se tuvo que asumir que la cantidad presente en la toma de muestra no fuera representativa del total.

El perfil cinético obtenido se muestra a continuación, donde se compara el resultado del experimento R9A34 con el experimento R9A33 en el que se utilizaba agitación magnética.

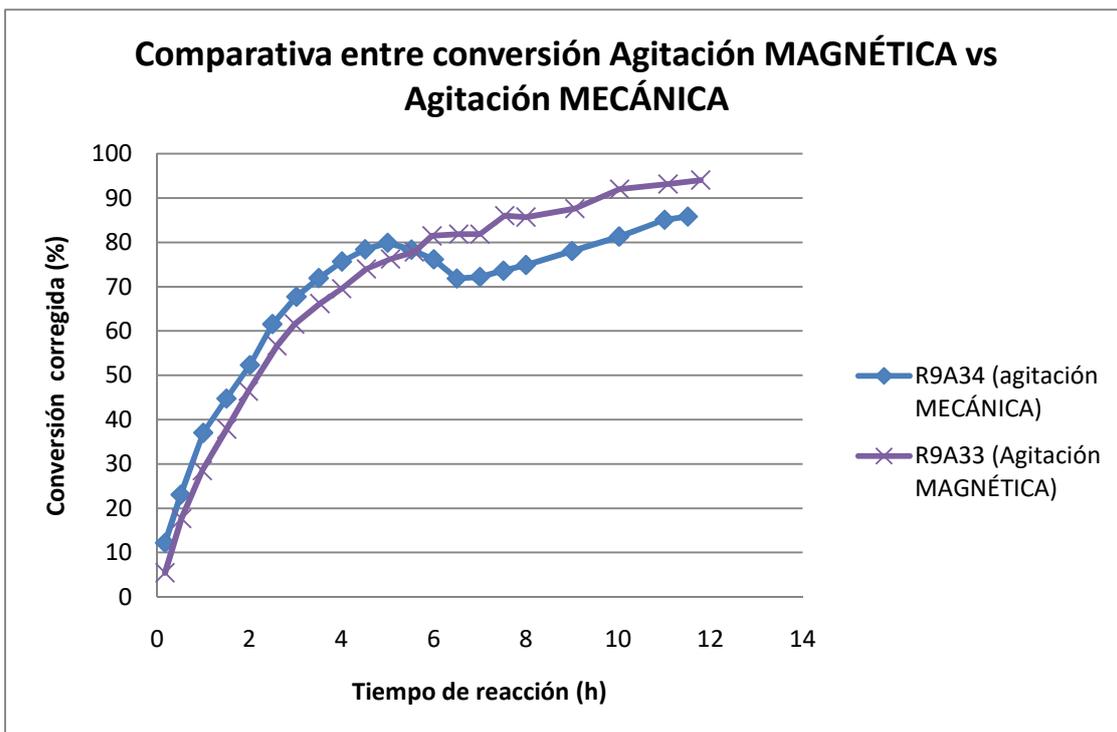


Imagen 88. Evolución comparativa de las reacciones R9A33 y R9A34

Tabla 73. Porcentaje de conversión corregida en los diferentes controles de la reacción R9A34.

	CONTROL REACCIÓN	HORAS REACCIÓN	% CONVERSIÓN CORREGIDA R9A34
R9A34	C1	0,17	12,2
	C2	0,51	23,1
	C3	1,00	37,0
	C4	1,50	44,7
	C5	2,01	52,3
	C6	2,50	61,6
	C7	3,02	67,8
	C8	3,50	71,9
	C9	4,01	75,7
	C10	4,51	78,4
	C11	5,00	79,9
	C12	5,52	78,4
	C13	6,00	76,2
	C14	6,50	71,8
	C15	7,00	72,2
	C16	7,51	73,6
	C17	8,00	74,9
	C18	9,00	78,1
	C19	10,02	81,3
	C20	11,01	85,1
	C21	11,51	85,8

Según se desprende del perfil cinético y de los datos anteriores, ambas reacciones transcurrieron a conversiones comparables, teniendo en cuenta el error inherente a la toma de muestra para el control en proceso. El comportamiento observado sobre las 5,5 h se atribuye precisamente a este efecto, puesto que progresivamente existía mucho más sólido

blanco en suspensión en el medio, a diferencia de experimentos anteriores. De nuevo, se concluye que la agitación mecánica es más efectiva y mantiene más cantidad de sólido no aglomerado. Además, en estas condiciones el enzima se mantiene funcional a pesar de que con la agitación mecánica pueden existir más fuerzas de cizalla que lo degraden, por lo que se considera importante que la velocidad de agitación sea moderada.

Visualmente, el aspecto de la suspensión en el experimento realizado en agitación mecánica era de un sólido mucho más fino, menos grumoso y más fluido que el del experimento realizado en agitación magnética.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, el reactor se dejó atemperar fuera del baño termostático hasta temperatura ambiente, hasta el día siguiente. Posteriormente se realizó el tratamiento del crudo de reacción.

Tal y como se ha comentado anteriormente la agitación mecánica mejora el aspecto físico de la reacción y, a pesar de la heterogeneidad del sistema, permite conseguir una suspensión menos grumosa y pegajosa. Por lo tanto, en los sucesivos experimentos se decidió incorporar este factor en las condiciones de reacción.

12.3. Estudio del efecto del grado de semi-purificación del biocatalizador

A pesar de que el propio producto de partida en el medio de reacción acuoso presentaba comportamiento de adhesión a las paredes del reactor, no parecía descartable que parte del aspecto pegajoso que se observaba en el medio de reacción tuviera su origen asociado a la presencia de componentes celulares presentes en el extracto enzimático que se añadía al medio como biocatalizador. En todos los experimentos realizados hasta la fecha, se había utilizado un extracto celular clarificado pero no purificado, puesto que la purificación de una proteína contribuye en gran medida a un aumento significativo de sus costes de producción, de manera proporcional (normalmente exponencial) al grado de pureza requerido.

El proceso de purificación tiene como finalidad aislar una o varias proteínas de una mezcla compleja que contiene restos celulares del microorganismo huésped. En una primera fase es posible separar partes proteicas de las no proteicas, para finalmente, y de manera mucho más minuciosa, normalmente a través de técnicas cromatográficas, aislar la proteína de interés del resto de proteínas acompañantes. Por ello, excepto en los casos en los que esté claramente justificado, en un entorno industrial se prioriza el uso de células enteras o extractos enzimáticos al de proteína purificada.

Con la finalidad de aportar información al respecto, se realizó un experimento adicional a lo establecido en el plan de trabajo original que consistía en el estudio del efecto del uso de una fracción semi-purificada del biocatalizador sobre el aspecto físico y la evolución de la reacción.

Así pues, y siguiendo protocolos internos, se procedió a preparar una fracción semi-purificada y posteriormente liofilizada del lote 05-USP12-P01. De esta manera, el biocatalizador utilizado en este experimento, codificado como R9A35, contenía menor cantidad de restos celulares que el extracto celular del cual procedía. El resto de condiciones de reacción se mantuvieron invariables (para más detalles, ver Anexo 1), incluyendo la agitación mecánica a 150 rpm.

Como en los experimentos anteriores, el pH se mantuvo controlado en un intervalo entre 6,38 y 6,50 por adición de sucesivas alícuotas de ácido acético 1 M durante el progreso de la reacción.

El aspecto físico del producto de partida en el medio de reacción fue, igual que se describe para R9A34, el de un gran grumo tipo bola conjuntamente con una parte más pegajosa unida a las paredes del matraz cuya homogeneidad rápidamente mejoró con la agitación mecánica. Se mantuvo un tiempo de contacto de cinco minutos previo a la adición del enzima, que se añadió al medio de reacción resuspendido en una fracción de un 20% del volumen total de la reacción (20 ml de agua), previamente atemperada a 45°C.

A medida que progresó el tiempo de reacción se observaba la presencia de mucha mayor cantidad de sólido blanco en suspensión, gran parte en forma de suspensión fina no apelmazada.

La toma de controles de proceso se realizó del mismo modo ya descrito para experimentos anteriores, fundamentalmente del sobrenadante heterogéneo. El tiempo total en el que se estudió la reacción fue de 10 h. El volumen total de ácido acético añadido correspondió a 12,80 ml.

La conversión final obtenida correspondió a un 99,6%. El perfil cinético obtenido se muestra a continuación:

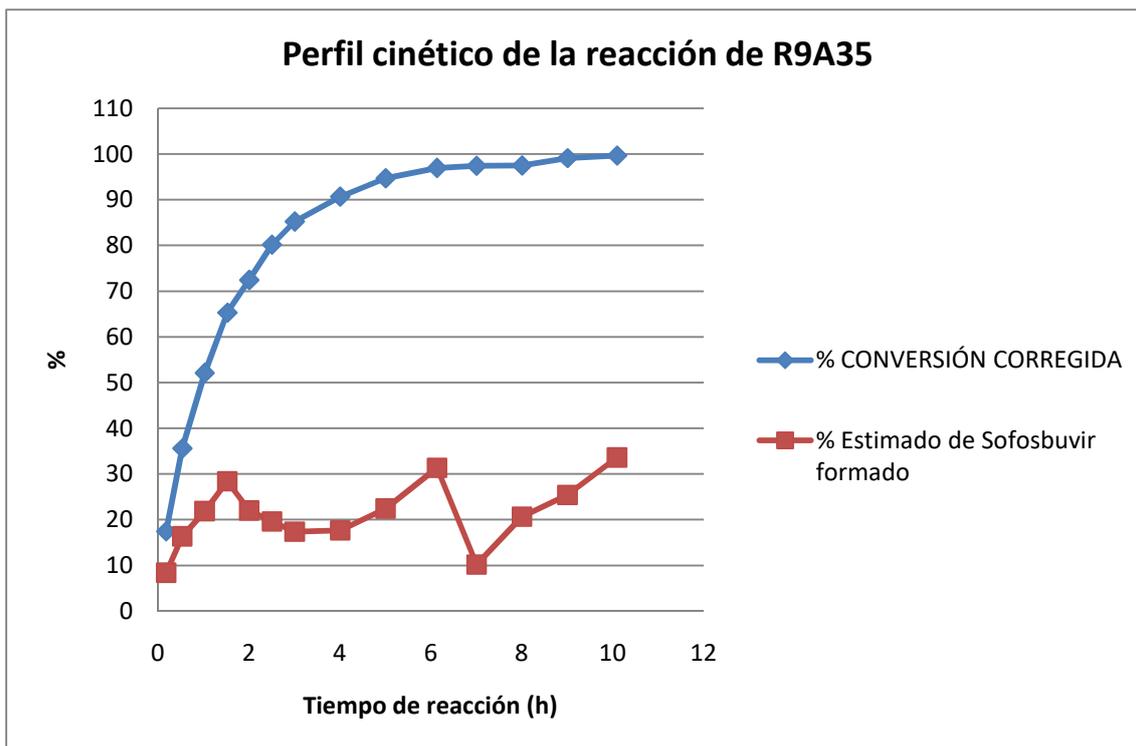


Imagen 89. Evolución de la reacción R9A35

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, el reactor se dejó atemperar fuera del baño termostático hasta temperatura ambiente, hasta el día siguiente. Posteriormente se realizó el tratamiento del crudo de reacción, según se describe en el correspondiente apartado.

Es de remarcar el aspecto del producto depositado en el reactor, consistente en un sólido blanquecino y nada apelmazado, que se filtró y lavó en agua fría (aproximadamente a 5°C). Sin mayor tratamiento que el indicado, la pureza por HPLC del producto sólido obtenido fue del 99,8%.

Así, la principal conclusión de este experimento fue que el formato semi-purificado y liofilizado del enzima permite obtener un sólido más pulverulento y menos pegajoso, que mejora el rendimiento, a la vez que facilita y simplifica el procesado del crudo de reacción.

Por tanto, a partir de este punto se consideró demostrado y justificado que el formato semi-purificado y liofilizado del enzima tiene mejores prestaciones que el formato de extracto celular no purificado, y por tanto, en los experimentos sucesivos se utilizó el enzima en forma semi-purificada y liofilizada.

12.4. Efecto de un medio acidificado desde el inicio de la reacción, sin corrección de pH durante el proceso

El objetivo de este apartado era evaluar la posibilidad de neutralización *in situ* del amoníaco formado en el medio de reacción, sin la necesidad de corrección del pH a lo largo de la reacción. Esta corrección se había realizado hasta la fecha mediante adiciones sucesivas de una solución de ácido acético 1M como agente neutralizante, pero el cambio a un medio acidificado desde el inicio, de ser posible, abría la puerta al uso de un sistema más sencillo.

Se pretendía comprobar la capacidad de neutralización directa de un medio ácido, por ejemplo, ácido acético o ácido cítrico, sobre un equivalente de amoníaco subproducto de la reacción de desaminación. En el caso de que esta neutralización fuera efectiva, se debería demostrar que la conversión, rendimiento y perfil de impurezas de la reacción no se veían afectados por este cambio.

12.4.1. Estudio del efecto del pH sobre la actividad de EcoCDA

Previamente al cambio del medio de reacción, se realizó un estudio sobre la actividad enzimática del biocatalizador en diferentes condiciones de pH, concretamente, en el intervalo comprendido entre $4,0 < \text{pH} < 7,0$. Para ello, se prepararon los correspondientes medios y se determinó la actividad enzimática sobre el sustrato 2'-desoxicitidina a través de su biotransformación a 2'-desoxiuridina.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 74. Valores de actividad enzimática del enzima en función del pH.

Valor de pH	Actividad enzimática (%)
7,0	100
6,5	73
6,0	75
5,5	58
5,0	30
4,5	6
4,0	2

A tenor de estos datos, se demostró que no era conveniente trabajar a valores de pH inferiores a 6,0 dado que el enzima estaría trabajando en condiciones subóptimas, inadecuadas para los objetivos del estudio.

Por tanto, se recomienda ajustar el valor de pH de trabajo en un rango comprendido entre 6,0 y 7,0, desaconsejando valores de pH inferiores a 6,0 que se traducen en una pérdida importante de actividad del enzima⁵³.

12.4.2. Pruebas preliminares de control de pH

Una vez establecido el intervalo seguro de trabajo en términos de actividad enzimática y de minimización de formación de impurezas del proceso, se consideraron dos ácidos débiles para llevar a cabo esta acidificación desde el inicio de la reacción. Estos dos ácidos fueron:

- Ácido acético. Monoprótico, con un valor de pK_a de 4,75
- Ácido cítrico. Triprótico, cuyos correspondientes valores de pK_a son los siguientes:
 - pK_{a1} : 3,15
 - pK_{a2} : 4,77
 - pK_{a3} : 6,40

En base a la información anterior, se descartó el uso de ácido acético, monoprótico, con valor de pK_a fuera del intervalo de pH seleccionado.

En cambio, para el ácido cítrico triprótico, era posible considerar su capacidad de neutralización cercana al valor de pK_{a3} .

Se realizaron diversos experimentos simulando las condiciones de una reacción de desaminación estándar, donde en cada experimento el medio de reacción (agua neutra) se sustituyó por una disolución de ácido cítrico que contenía el número equivalentes de dicho ácido, ajustado el valor de pH inicial según se muestra en la tabla siguiente. A continuación, se añadió gota a gota la cantidad de amoníaco correspondiente a 1 equivalente, cantidad que teóricamente se formaría en esta reacción virtual⁵⁴. El pH de la reacción ascendió hasta el valor de pH final que se indica en la misma tabla.

Adicionalmente, en cada experimento se calculó la cantidad de residuo salino de citrato amónico formado por Kg de producto final formado suponiendo conversión total.

⁵³ Aunque se ha demostrado que el enzima es operativo a valores superiores, incluso a valores cercanos a pH 9, la formación de impurezas a estos valores desaconseja trabajar fuera del rango $6,0 < pH < 7,0$

⁵⁴ En este experimento no se utilizó ni sustrato ni enzima, por lo que no era posible que se generara amoníaco, que se añadió externamente de manera controlada.

Tabla 75. Experimentos enfocados a la evaluación de utilizar un medio ácido desde el inicio de la reacción.

Experimento	Ácido Cítrico (g)	[Ácido cítrico] (g/l)	Eq. Ácido cítrico	pH inicial	pH final	Kg Residuo salino/Kg sofosbuvir formado
1	3,9	48,8	1,5	6,01	8,68	0,69
2	5,2	65,0	2,0	6,01	8,56	0,92
3	10,3	128,8	4,0	6,01	7,66	1,84
4	12,9	161,3	5,0	6,05	7,41	2,30
5	20,6	257,5	8,0	6,05	6,61	3,67
6	23,3	291,3	9,0	6,01	6,31	4,13
7	23,1	288,8		6,42	7,57	

Tal como puede observarse (experimento 6), son necesarios del orden de 9 equivalentes de ácido cítrico para poder neutralizar un equivalente de amoníaco y que el pH de la reacción quede comprendido en el intervalo deseado. Aún así, cuando en estas mismas condiciones, el pH inicial se ajusta a un valor más cercano al real inicial⁵⁵ (experimento 7), el medio llega a alcanzar un valor de pH fuera del rango deseado, hasta 7,57.

Por todo lo mencionado hasta este punto, tomando en gran consideración la cantidad de sales generadas durante esta neutralización, finalmente se descartó realizar la reacción biocatalítica utilizando el sistema de neutralización *in situ* del amoníaco formado y conservar el método de adición controlada de ácido acético para ir ajustando el pH a medida que progresa la reacción de desaminación.

12.5. Efecto del uso de un cosolvente orgánico miscible en agua

El objetivo de este apartado era evaluar la posibilidad de aumentar la solubilidad de producto de partida y producto final en el medio de reacción, para poder disminuir la heterogeneidad de la masa de reacción, evitando el aspecto pastoso de la misma, a la vez que incrementar la carga del reactor.

Se pretendió comprobar el comportamiento de la reacción en presencia de determinados solventes orgánicos. En este apartado se estudió el efecto de un cosolvente miscible en agua sobre la reacción biocatalítica.

En el caso de que esta adición fuera posible, se debería demostrar que la conversión, rendimiento y perfil de impurezas de la reacción mejoraban con este cambio.

⁵⁵ Se toma como base de cálculo la reacción R9A32, donde la variación de pH fue entre 6,35 y 6,55.

12.5.1. Estudio del efecto de cosolventes orgánicos sobre la actividad de EcoCDA

Previamente a los ensayos con cosolventes, se realizó un estudio sobre la actividad enzimática del biocatalizador en diferentes disolventes, seleccionados teniendo en cuenta:

- 1) solubilidad de producto de partida y producto final;
- 2) miscibilidad en agua;
- 3) P_{eb} superior a temperatura de reacción.

Los candidatos a estudio fueron: MeOH, EtOH, ACN y THF.

Para ello, se determinó la actividad enzimática sobre el sustrato 2'-desoxicitidina a través de su biotransformación a 2'-desoxiuridina en diferentes porcentajes de cada uno de los disolventes anteriores.

Los resultados que se obtuvieron se muestran a continuación:

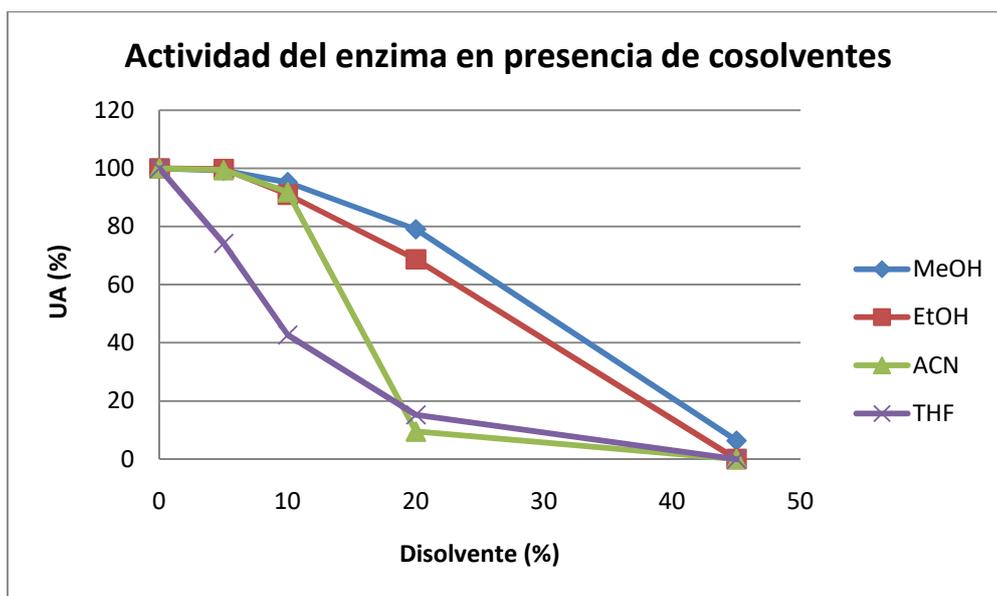


Imagen 90. Efecto de la presencia de cosolventes orgánicos en la determinación de actividad del enzima (el valor del 100% corresponde a la actividad enzimática en las condiciones estándar, es decir, en medio acuoso tamponado y ausencia de solventes orgánicos). La medida se realiza a 5 minutos de tiempo de contacto

Según se observa en el gráfico anterior, la presencia de bajos porcentajes de THF afecta en gran medida a la actividad enzimática, con una pérdida de actividad del 26% con tan solo un 5% de THF.

Hasta un porcentaje del 10%, la presencia de MeOH, EtOH y de ACN afecta de manera similar al enzima, con una pérdida de actividad comprendida entre el 5 y 8%. En cambio, a medida que la cantidad de disolvente aumenta, el comportamiento de ACN se aleja del de los alcoholes, de manera que un 20% de ACN tiene un efecto dramático sobre la actividad, con una pérdida del 90% respecto de la capacidad de transformación en condiciones estándar.

Al porcentaje del 20%, MeOH mantiene un 79% de la actividad mientras que EtOH mantiene un 69%.

A tenor de estos datos, el disolvente que se seleccionó fue el MeOH, y se decidió utilizarlo a porcentajes no superiores al 10%.

12.5.2. Estudio del efecto de la presencia de MeOH sobre la reacción

Una vez seleccionado el disolvente, se procedió a determinar la solubilidad de producto de partida y de sofobuvir en las nuevas condiciones, considerando la presencia de un 10% de MeOH como cosolvente de reacción:

Tabla 76. Valores experimentales de solubilidad del producto de partida y del producto final a 45°C en agua con y sin MeOH como cosolvente.

Compuesto	Solubilidad (g/l) (Agua/MeOH 90/10, 45°C)	Solubilidad (g/l) (Agua, 45°C)
Intermedio 3.2	33,7	23
Sofobuvir	15,3	9

En el experimento R9A36 se incorporaron las mejoras conseguidas en los experimentos anteriores, con la única variable del cambio de medio de reacción, siendo en este caso una mezcla agua/metanol 90/10.

Como en los experimentos anteriores, el pH se pretendió mantener controlado en el intervalo preestablecido por adición de sucesivas alícuotas de ácido acético 1M durante el progreso de la reacción.

El aspecto físico del producto de partida en el medio de reacción era el de una suspensión blanquecina de mayor solubilidad a la observada en experimentos anteriores. El enzima se adicionó al medio según lo indicado anteriormente, momento en el que se observaba como la suspensión blanquecina se enturbiaba ligeramente y pasaba a un color menos blanco.

A pesar de que en los primeros minutos de reacción se observó una cierta variación de pH, ésta era inferior a la obtenida en experimentos anteriores. A partir de 1 hora de reacción, la variación de pH fue prácticamente inexistente, por lo que aparentemente el progreso de la reacción era anómalamente bajo. Aún así, se mantuvo el experimento en estudio hasta 6,5 horas, con el objetivo de disponer de la serie de resultados analíticos mediante técnica cromatográfica HPLC. El volumen total de ácido acético añadido fue de 0,77 ml.

A partir de los 15 minutos de reacción apareció un sólido grumoso depositado en el fondo del balón que iba cambiando a una textura más pegajosa. Posteriormente, este comportamiento se atribuyó a la coagulación y precipitación de componentes del enzima en el medio orgánico, y no a producto de partida ni producto final.

Las observaciones realizadas se traducen en el perfil cinético que se muestra a continuación. Los resultados de este experimento se comparan con los del experimento R9A35:

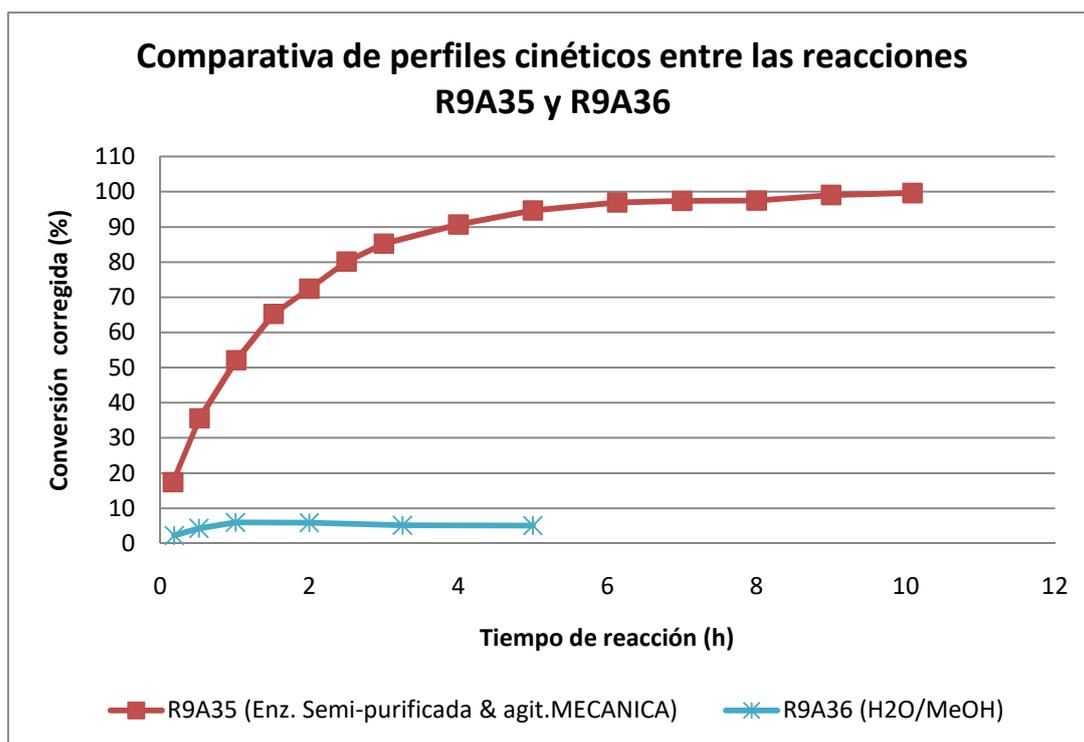


Imagen 91. Efecto de la presencia de 10% de MeOH en la evolución de la reacción

A tenor del gráfico anterior se puso de manifiesto que el tiempo de contacto en el que EcoCDA es capaz de mantener su funcionalidad en este medio orgánico es insuficiente para conseguir un adecuado progreso de la reacción.

Por ello, se descartó utilizar como medio de reacción una mezcla agua/metanol 90/10.

12.6. Efecto del uso de un solvente orgánico (en un sistema bifásico L-L)

El objetivo de este apartado era evaluar la posibilidad de mejorar la solubilidad de producto de partida y/o del producto final en el medio de reacción, para poder disminuir la heterogeneidad de la masa de reacción, evitando el aspecto pastoso del mismo, a la vez que incrementar la carga del reactor y simplificar el procesado del crudo de reacción.

Como se ha comentado, se pretendía comprobar el comportamiento de la reacción en presencia de determinados solventes orgánicos. En concreto, en este apartado se estudió el efecto de un solvente inmiscible en agua sobre la reacción biocatalítica, en particular, de acetato de etilo (AcOEt).

En el caso de que la presencia de AcOEt fuera posible, se debería demostrar que la conversión, rendimiento, perfil de impurezas y procesado del crudo de la reacción mejoraban con este cambio.

Fijado el disolvente, se procedió a determinar la solubilidad de producto de partida y sofobuvir en este medio, dado que se esperaba que existiera un cierto reparto de cada componente entre las dos fases:

Tabla 77. Valores experimentales de solubilidad del producto de partida y del producto final a 45°C en agua y en AcOEt.

Compuesto	Solubilidad (g/l) (AcOEt, 45°C)	Solubilidad (g/l) (Agua, 45°C)
Intermedio 3.2	ca 10 ⁵⁶	23
Sofobuvir	>78,8	9

12.6.1. Estudio del efecto de la presencia de AcOEt sobre la reacción

La reacción R9A37 se realizó en las mismas condiciones que el experimento R9A35⁵⁷, donde para no alterar la concentración inicial de sustrato se utilizó un volumen de reacción de 200 ml compuesto por una mezcla 50/50 agua/AcOEt.

Para evitar que el enzima estuviera en contacto directo con el disolvente orgánico, pudiendo desnaturalizarse y perder funcionalidad, el disolvente AcOEt atemperado a 45°C se añadió lentamente al medio de reacción, evitando la formación de turbulencias, una vez que el reactor ya contenía el producto de partida y el biocatalizador a la temperatura de reacción. En este caso se mantuvo una suave agitación mecánica a una velocidad de 100 rpm.

⁵⁶ A ligera sobresaturación, el producto presenta aspecto pegajoso enganchado al fondo del recipiente. Cuando se enfría la solución queda turbia

⁵⁷ A excepción del lote de producto de partida, y evidentemente, el medio de reacción. Ver detalles en Anexo 1

Aún así, hay que tener en cuenta que el disolvente presenta una cierta solubilidad en agua. Teniendo en cuenta datos bibliográficos⁵⁸ (2 g/100 ml a 20°C y 45 g/100 ml a 81°C), se estima que a 45°C la fase acuosa puede contener del orden de un 8% de AcOEt disuelto. Este porcentaje estimado se suponía que iba a estar inevitablemente en contacto con el biocatalizador en la fracción correspondiente a la fase acuosa.

A pesar de las precauciones anteriores, se observó en el fondo del reactor un sólido pegajoso de identidad dudosa. El pH de la fase acuosa se controló según lo establecido, aunque el comportamiento derivado de la poca variación de pH de nuevo sugirió la ausencia de reacción. Así, a partir de los 30 minutos de reacción no fue necesaria ninguna adición de ácido acético para corregir el pH, que incluso disminuyó progresivamente a medida que progresaba el tiempo, desde un valor de 6,48 hasta 6,14 a las 4,5 horas de reacción, tiempo en el que se detuvo definitivamente. El volumen total de ácido acético añadido fue de 0,4 ml.

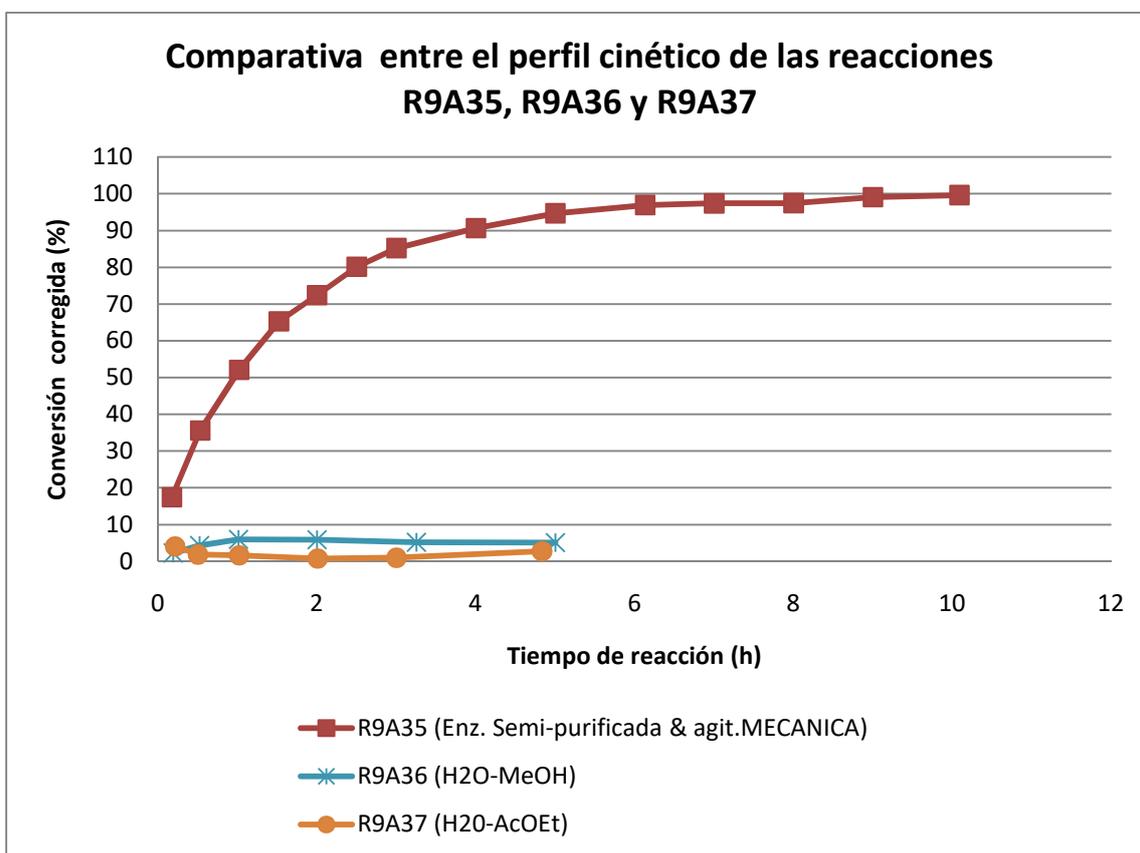


Imagen 92. Efecto de la presencia de AcOEt en el medio sobre la evolución de la reacción

Transcurrido el tiempo de reacción, el crudo se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, y las fases acuosa y orgánica se separaron. Cuando la fase orgánica se concentró a sequedad se

⁵⁸ Monografía de AcOEt en "The Index Merck", 12th Ed.

obtuvieron 6,23 g de un sólido blanco que contenía en porcentaje de área un 94% de producto de partida y un 3% de sofosbuvir.

A tenor de los resultados anteriores se puso de manifiesto que en presencia de AcOEt el enzima no presenta funcionalidad, tal como se observa en el gráfico anterior. El análisis cromatográfico de la fase acuosa y de la fase orgánica mostró como ambos productos están repartidos en las dos fases, por lo que el producto de partida migra ya desde tiempo cero a la fase orgánica, donde aumenta progresivamente a medida que progresa el tiempo de contacto. Dado que el enzima no es funcional en la fracción en la que se encuentra mayoritariamente el producto de partida, la evolución de la reacción es prácticamente despreciable.

Por ello, se descartó utilizar como medio de reacción una mezcla bifásica agua/AcOEt 50/50 y se decidió no seguir explorando esta vía.

12.7. Estudio de la recirculación o re-uso de las aguas madres de reacción en dos lotes sucesivos de reacción

En este apartado se pretendió evaluar y comparar la posibilidad de recircular las aguas resultantes de la reacción, una vez filtrada o decantada la fracción de sólido, puesto que en estas aguas permanecía el producto de partida no reaccionado, sales inorgánicas de acetato amónico y componentes enzimáticos, entre otros. Hasta la fecha, se desconocía si el enzima mantenía parte de su actividad una vez finalizado el proceso. En caso afirmativo, la recirculación permitiría optimizar el proceso y reducir costes de materias primas dado que para la realización del segundo lote solo sería necesario suplementar las cantidades de intermedio 3.2. y de enzima hasta conseguir de nuevo las condiciones iniciales.

Un objetivo importante de este apartado era comparar los dos lotes sucesivos, en conversión, aspecto físico y perfil de impurezas.

12.7.1. Ciclo 1: Reacción R9A38

Este experimento se realizó en las condiciones descritas en el Anexo 1, con un tiempo total de toma de muestra de 12 h. La cantidad de ácido acético 1M añadido fue de 7,0 ml. La conversión obtenida a tiempo final fue del 82%.

El crudo de reacción ya a temperatura ambiente se filtró, y en las aguas madres de esta filtración se analizó el contenido en producto de partida no reaccionado, obteniéndose 0,136 g del intermedio 3.2. no reaccionado y 0,513 g de sofosbuvir formado, disuelto en esta fase. Además, se determinó la funcionalidad remanente del enzima post-reacción, siendo del 22%;

es decir, transcurridas 24 horas, las aguas madres contienen 0,22 equivalentes de biocatalizador todavía funcional.

12.7.2. Ciclo 2: Reacción R9A39

El segundo ciclo se realizó usando como medio de reacción las aguas madres del experimento R9A38, a las que se añadió la cantidad necesaria de producto de partida y de enzima hasta completar la cantidad correspondiente a 1 equivalente para cada uno de ellos. En este caso, el pH inicial de la reacción se mantuvo alrededor de pH 7, es decir, no disminuyó tanto con la adición del sustrato, puesto que el medio ya contenía una cantidad de sales de acetato amónico que pudieron actuar en cierta manera como tampón.

La reacción transcurrió según lo habitualmente observado, la monitorización se realizó durante 6,5 h, tiempo durante el cual se añadieron al medio 8,6 ml de ácido acético 1M. Se consideró un tiempo suficiente para comparar la reacción de estudio, R9A39 con la reacción R9A38, pasado el cual la reacción se detuvo al ser considerada totalmente comparable a la anterior, ya que la conversión obtenida para R9A39 a 6,5h fue del 76%, equivalente a la obtenida en el mismo tiempo en R9A38.

La comparativa entre los perfiles de reacción de ambos experimentos se muestra a continuación:

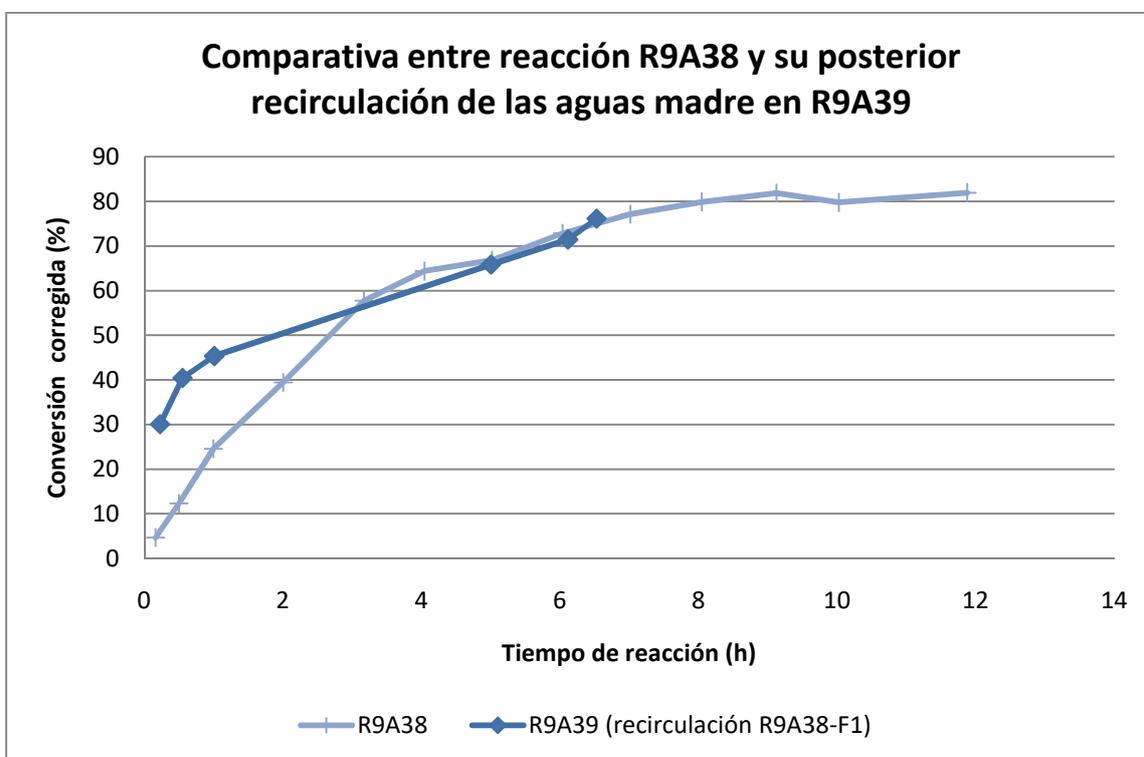


Imagen 93. Comparativa perfiles de reacción R9A38 y R9A39 (conversión total acumulada de sofosbuvir)

Tal como se muestra en este gráfico, en R9A39 a tiempo cero de reacción se detectó una cantidad de sofobuvir anómalamente más elevada que en experimentos anteriores, y en particular, más elevada que en el experimento R9A38. Este efecto es debido a que la concentración inicial de sofobuvir no era cero, puesto que también se había recirculado parte del producto formado en el experimento R9A38 que estaba en disolución en las aguas madres. Progresivamente, a medida que transcurrió la reacción R9A39 y la concentración de sofobuvir en el medio aumentó, éste precipitó parcialmente y ambos perfiles se acaban asemejando y finalmente solapando.

Para evitar esta distorsión, se recalculó la conversión a partir del producto formado *de novo* en R9A39, eliminando la contribución de la cantidad de sofobuvir recirculada.

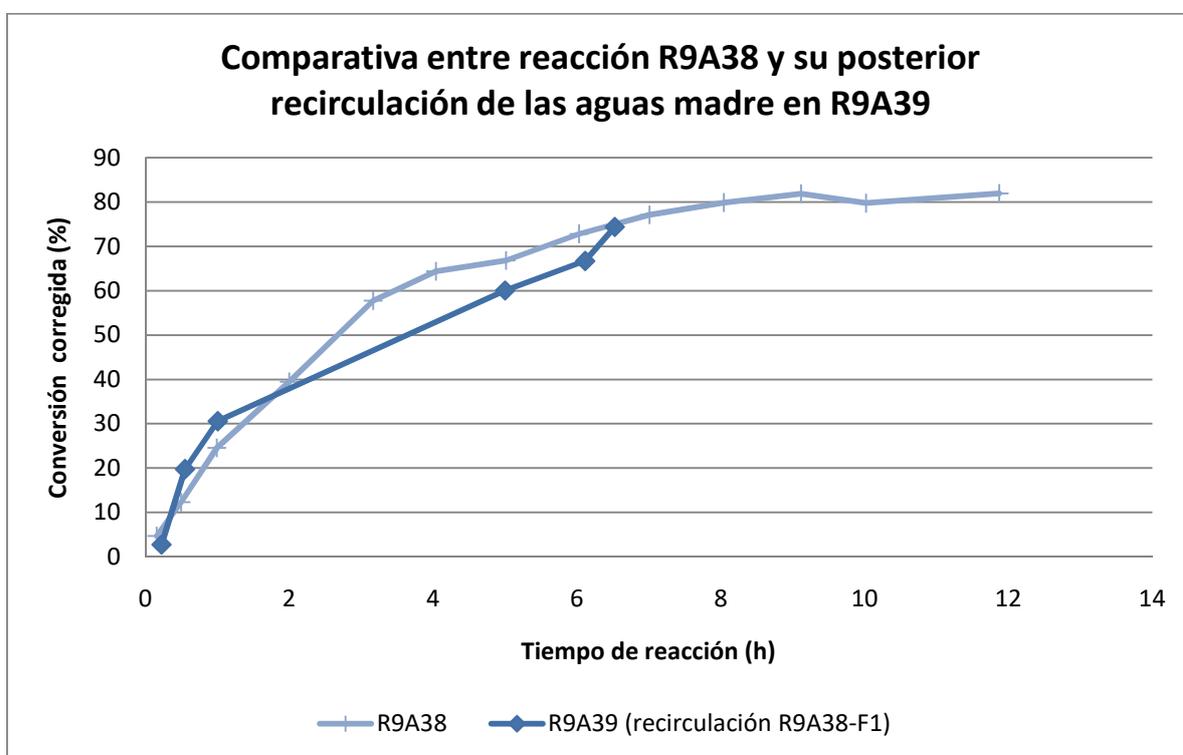


Imagen 94. Comparativa perfiles de reacción R9A38 y R9A39 (corrección de la conversión de sofobuvir formado *de novo*)

Realizada esta corrección ambos perfiles cinéticos son más similares e incluso convergentes, a pesar de la variabilidad inherente a la toma de muestra del medio heterogéneo. En base al parámetro conversión, se concluyó que la recirculación de las aguas madres de reacción entre dos experimentos sucesivos rinde resultados reproducibles.

En relación al perfil de impurezas obtenido en ambos experimentos, la siguiente tabla describe y compara el contenido en impurezas a las 6h de reacción, prácticamente tiempo final del experimento R9A39. En cada caso, se incluye información sobre su origen y evolución global a lo largo del tiempo de reacción.

Tabla 78. Impurezas detectadas en las reacciones R9A38 y R9A39.

Asignación	t_R (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) ⁵⁹	Origen	Reacción R9A38		Reacción R9A39	
				Área impureza (%) a t_{rx} 6h ⁶⁰	Evolución de la impureza en la reacción	Área impureza (%) a t_{rx} 6h ⁶¹	Evolución de la impureza en la reacción
Impureza 0	11,3	279-280	Proceso	ND	ND	ND	ND
Impureza 1	12,4	262	Proceso	ND	ND	ND	ND
Impureza 2	15,1	280	Materia prima (Lotes MMG-263-048-02 y MMG-263-049-03)	0,57	Estable	1,39	Estable
Impureza 3	16,5	262	Proceso	ND ⁶²	ND	0,55	Estable
Impureza 4	18,4	272	Proceso	ND	ND	ND	ND
Impureza 4b	18,4	260	Proceso	3,25	Aumenta	6,63	Aumenta
Impureza 5	15,9	278	Materia prima (Lotes MMG-263-048-02 y MMG-263-049-03)	1,43	Disminuye	0,92	Disminuye
Impureza 6	18,2	No Spectra	Proceso	0,30	Estable	0,45	Estable
Impureza 7	18,8	270-272	Materia prima (Lote MMG-263-049-03)	0,39	Estable	0,60	Estable
Impureza 8	20,03	262	Materia prima (Lotes MMG-263-048-02 y MMG-263-049-03)	1,14	Aumenta ligeramente	1,14	Aumenta ligeramente
Impureza 9	17,2	278	Materia prima (Lote MMG-263-049-03)	ND	Disminuye	ND	Disminuye

13. Transformación biocatalítica del fragmento B-NH2 a fragmento B

13.1. Reacción de tipo prueba de concepto (PoC)

El objetivo de este apartado consistió en determinar si el enzima era capaz de realizar la misma transformación de desaminación en el sustrato fragmento B-NH2 de manera equivalente a lo observado para el sustrato 3.2., abriendo así la posibilidad de una nueva ruta para la obtención

⁵⁹ Los valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ comprendidos entre 270-272, 278 y 280 nm son perfiles con absorbancia similar al producto de partida intermedio 3.2 ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 278 nm). Los valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ 260 y 262 nm son perfiles con absorbancia similar al producto de final sofosbuvir ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 260 nm)

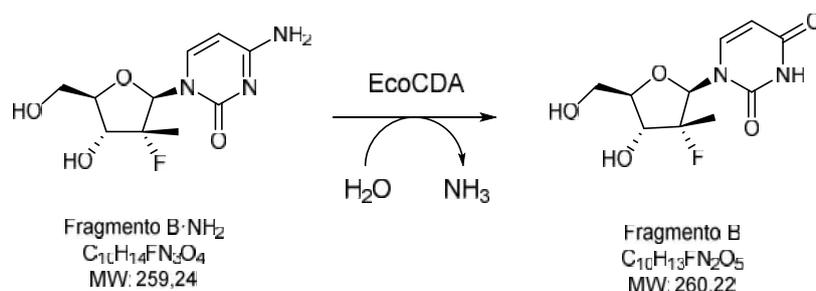
⁶⁰ Conversión a sofosbuvir del 72,8% a las 6,03 horas de reacción (R9A38-C8)

⁶¹ Conversión a sofosbuvir del 71,5% a las 6,11 horas de reacción (R9A39-C8)

⁶² Se detecta en el análisis del filtrado de la reacción después de 12 horas a temperatura ambiente y sin ajuste del pH (R9A38-F1) con un porcentaje de área del 0,74%

de sofosbuvir. A pesar de lo avanzado del proyecto en este punto, se estudió esta vía tras acuerdo con el *partner* industrial con el que se contaba por si podía ser económicamente más atractiva o más sencilla nivel regulatorio, para tenerla como *backup*, no tanto porque en ese momento se estuviera planteando la posibilidad de cambiar el enfoque del proyecto.

El esquema de la reacción se muestra a continuación:



Las condiciones de reacción para el ensayo PoC con EcoCDA se muestran a continuación:

Volumen de reacción: 4 ml

Concentración de nucleósido sustrato (intermedio 3.1.=fragmento B·NH₂, lote 2014-443): 7,5 mM (0,97 g/l)

Medio de reacción: agua pH 7,07

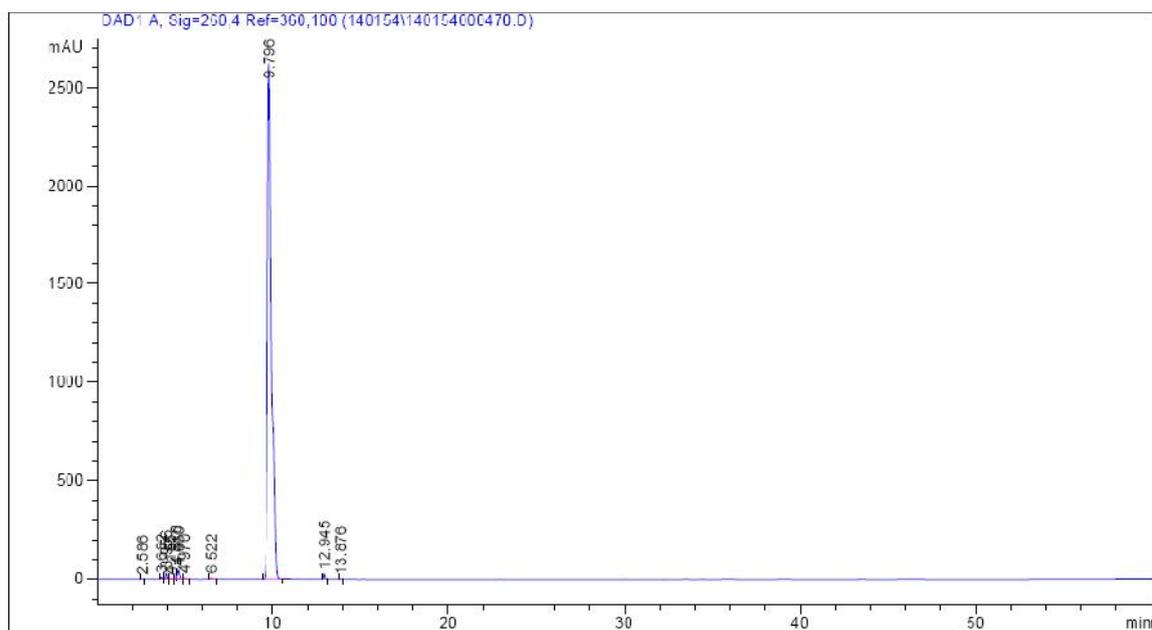
Estequiometría enzima/sustrato: 1 equivalente

Temperatura de incubación: 45°C

Tiempo de incubación: 24 horas (agitación magnética 300 rpm)

La monitorización de las reacciones se llevó a cabo a 6 y 24 h, mediante la toma de controles intermedios de reacción, que se diluyeron en metanol y agua. Las alícuotas se filtraron inmediatamente por un filtro de 10 KDa por centrifugación a 4500 rpm a 25°C. Las muestras se analizaron por HPLC, observando ya a las 6 horas la completa desaparición del pico cromatográfico correspondiente al producto de partida, así como de los picos minoritarios cercanos⁶³, y la formación de un nuevo pico cromatográfico a tr=9,96 min y 97,2% de área relativa, con un perfil UV atribuible a derivado uridínico ($\lambda_{\text{máx}}$ =260-262 nm). La confirmación se realizó por comparación con el tiempo de retención de una muestra patrón de fragmento B proporcionado por el *partner* industrial. El tiempo de retención del patrón fue de 10,03 min.

⁶³ El área por HPLC del pico mayoritario, de tr=4,612 min, es de 76%. Existen otros dos picos con el mismo perfil UV que el pico principal, a tr=3,917 min y tr=4,147 min, cuya área es del 6,43% y 15,82%, respectivamente. Como aproximación, se consideró que la pureza del producto es por tanto del 76%



Signal 1: DAD1 A, Sig=260,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.586	BB	0.0636	5.32105	1.25052	0.0127
2	3.682	BV	0.0984	62.99796	9.37236	0.1500
3	3.956	VV	0.0820	158.38173	28.85989	0.3771
4	4.155	VB	0.0881	8.62375	1.43496	0.0205
5	4.518	BV	0.0859	278.85550	49.34938	0.6639
6	4.660	VV	0.1087	344.45856	46.37440	0.8200
7	4.970	VB	0.1108	40.67938	5.34464	0.0968
8	6.522	BB	0.1406	61.24068	6.34717	0.1458
9	9.796	BB	0.2303	4.08964e4	2617.28662	97.3613
10	12.945	BB	0.0787	141.38498	27.17991	0.3366
11	13.876	BB	0.0716	6.42781	1.39927	0.0153

Totals : 4.20048e4 2794.19912

Imagen 95. Cromatograma HPLC del crudo de reacción R10A1

Así pues, bajo las condiciones indicadas, el enzima EcoCDA desarrollado en este proyecto demostró ser capaz de transformar el sustrato fragmento B-NH2 en el producto fragmento B de manera cuantitativa.

14. Transferencia de tecnología: reacciones de demostración en presencia del partner industrial

14.1. Transformación biocatalítica del intermedio 3.2. a sofobuvir

14.1.1. Reacción R9A40

El experimento R9A40 se realizó a partir de un ligero exceso en la cantidad habitual de biocatalizador para intentar transformar completamente el producto de partida y conseguir conversión cuantitativa. Así, se decidió utilizar 1,15 equivalentes de enzima en esta reacción, manteniendo el resto de condiciones idénticas a las utilizadas en el experimento R9A38. La adición de enzima fue escalada, iniciando la reacción con 0,9 equivalentes y añadiendo 0,25 equivalentes adicionales a las 2,8h.

La monitorización del pH se realizó del modo habitual, con adiciones sucesivas y controladas de ácido acético 1 M, aunque en este caso se observó que comparativamente a experimentos anteriores, a tenor de las cantidades añadidas, aparentemente el progreso de la reacción estaba siendo más lento. El volumen final de ácido utilizado para neutralizar el amoniaco formado durante la reacción fue de 6,46 ml.

La representación gráfica de la evolución de la reacción, medida a través de su conversión, se muestra a continuación:

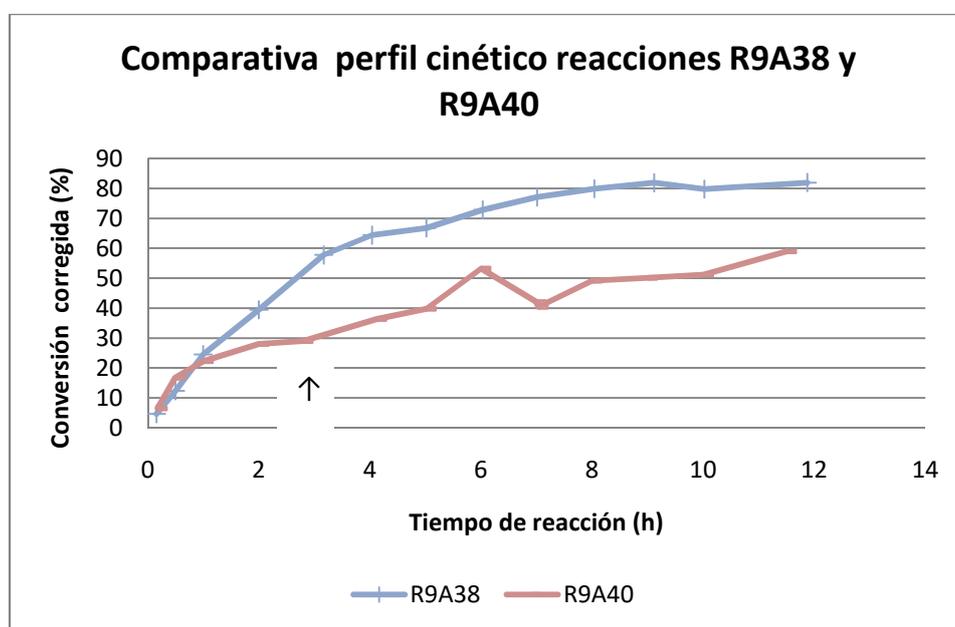


Imagen 96. Comparativa perfiles de reacción R9A38 y R9A40 (la flecha indica el momento en el que se ha añadido la cantidad adicional de enzima hasta completar los 1,15 eq deseados)

Así, se comprobó que a pesar de que el experimento R9A40 se inició con 0,9 equivalentes y el experimento R9A38 se inició con 1 equivalente, a partir de 1 hora de reacción, la evolución de R9A40 se fue diferenciando progresivamente de lo esperado, y a tiempo final estudiado solo llegó a alcanzar un 60% de conversión. Dado que este comportamiento no corresponde a la tendencia general de los experimentos realizados hasta la fecha se decidió repetir el experimento.

Cabe remarcar que, en este experimento, la toma de muestra a tiempo 7 h se realizó en dos puntos del reactor: por una parte, de la suspensión heterogénea (según metódica habitualmente realizada a lo largo de todo el proyecto) y simultáneamente, del fondo del reactor, donde estaban depositados una mayor cantidad de sólidos.

En ambos casos, el porcentaje de conversión⁶⁴ es del 40% (concretamente, 40,4% en el fondo del reactor y 42% en el sobrenadante en suspensión). En cambio, si se toma como base de cálculo la cantidad de sofosbuvir formado, entonces sí se obtienen valores sustancialmente diferentes en función del punto de toma de muestra: 40,2% en el fondo del reactor y tan solo un 11,6% en la suspensión.

14.1.2. Reacción R9A41

Posteriormente, se realizó el ensayo R9A41 como una nueva réplica del experimento R9A40, en el que se utilizó una cantidad de enzima de 1,15 equivalentes desde el inicio de la reacción, pero en el que se sustituyó el lote de producto de partida MMP-263-049-03 por el MMG-263-048-02.

La reacción transcurrió según lo esperado, con un consumo de ácido acético 1M añadido correspondiente a 10,37 ml. La conversión alcanzó el 95% a las 12 h de reacción.

En este caso, la comparativa entre las dos reacciones realizadas se muestra a continuación:

⁶⁴ Corregida a partir de los factores de respuesta de producto de partida y de producto final.

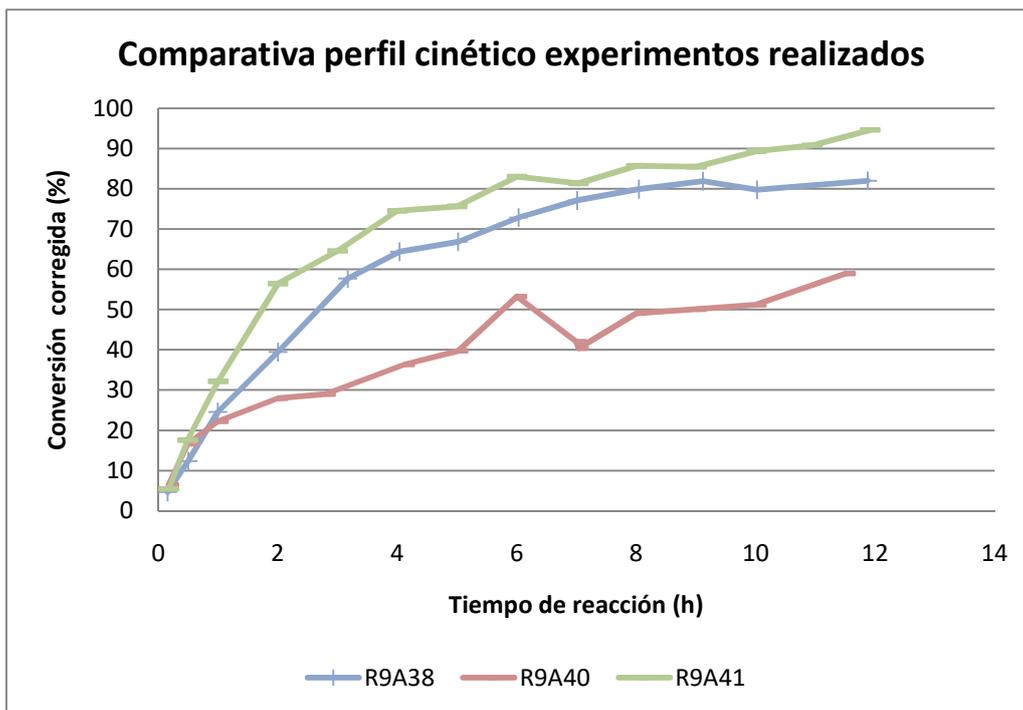


Imagen 97. Comparativa perfiles de reacción R9A38 con R9A40 y R9A41

Tal como se observa, el comportamiento del experimento R9A41 fue superior a sus dos antecesores más directos. Estos resultados se atribuyen fundamentalmente a dos factores principales:

- R9A41 utilizó como producto de partida el lote de intermedio 3.2. MMG-263-048-02 en vez del lote MMG-263-049-03 usado en los otros dos experimentos;
- R9A41 utilizó como biocatalizador 1,15 equivalentes de enzima (desde el inicio de la reacción), a diferencia del 1 equivalente en R9A38 (desde el inicio de la reacción) o del 0,9 equivalentes en R9A39 (al inicio de la reacción) suplementado con los 0,25 equivalentes restantes adicionados posteriormente.

Sea cual fuere la principal causa a la que pueda atribuirse esta mejoría, el comportamiento de la reacción obtenido en el experimento R9A41 corresponde perfectamente a los resultados observados en la mayoría de experimentos realizados en este período del trabajo.

14.2. Transformación biocatalítica del fragmento B·NH₂ a fragmento B

Durante la fase de transferencia de tecnología al *partner* industrial, la reacción de desaminación del sustrato fragmento B·NH₂ (SOF-B0) se repitió a mayor escala y a la misma concentración a la que se realizó la reacción de obtención de sofobuvir. Es importante

remarcar que las condiciones utilizadas se seleccionaron de manera arbitraria, sin ninguna optimización previa.

Las condiciones de la reacción R10A2 con EcoCDA se muestran a continuación:

Volumen de reacción: 66 ml

Concentración de nucleósido sustrato (intermedio 3.1.=fragmento B·NH₂, lote 2014-443, pureza por HPLC=99,4 %): 133 mM (41,6 g/l)

Medio de reacción: agua pH 7,00 (sin control de pH)

Estequiometría enzima/sustrato: 1 equivalente (enzima semi-purificado y liofilizado)

Temperatura de incubación: 45°C

Tiempo de monitorización de la reacción: 5 horas (agitación mecánica 150 rpm)

La monitorización de las reacciones se llevó a cabo a durante las 5 h, mediante la toma de controles intermedios de reacción, que se diluyeron en metanol y agua. Las alícuotas se filtraron inmediatamente por un filtro de 10 KDa por centrifugación a 13000 rpm a 25°C.

En el primer control de reacción realizado a 30 minutos se observó la completa desaparición del pico cromatográfico correspondiente al producto de partida, y la formación del pico cromatográfico a $t_r=9,7$ min y 97,3% de área relativa, correspondiente al producto final esperado.

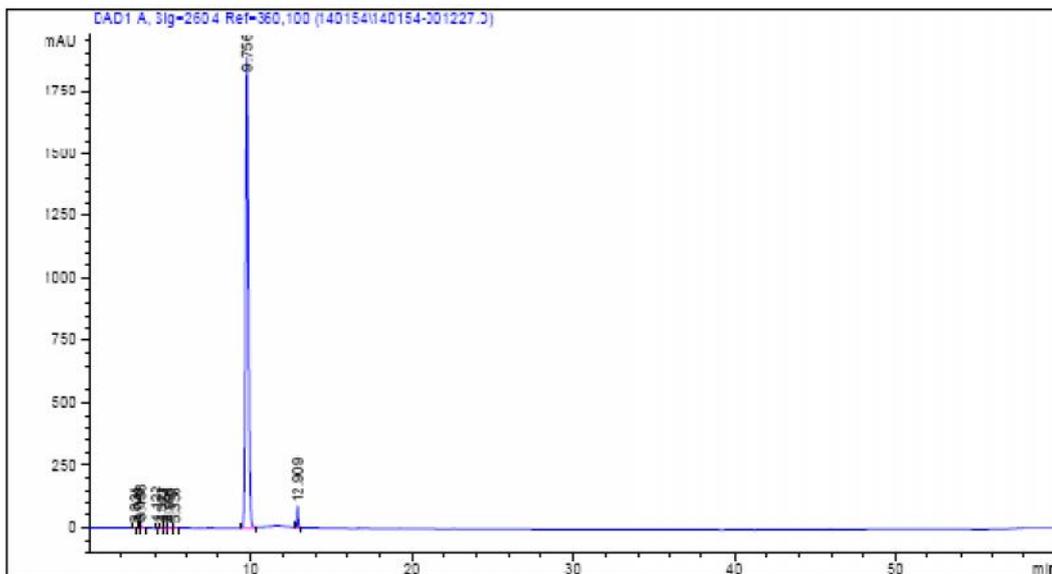
Adicionalmente al pico principal, existe un pico secundario a tiempo de retención de 12,9 minutos, que no está presente en el producto de partida, y que aparentemente se formó como impureza de reacción en este experimento, aunque cabe remarcar que no se detectó en el experimento de PoC anterior.

Data File D:\HPCHEM\1\DATA\140154\140154-001227.D
 Sample Name: R10A2-C1 1/40

```

=====
Acq. Operator   : CLG                               Seq. Line :   18
Acq. Instrument : HPLC1100                          Location  : F177-04
Injection Date  : 4/14/2016 5:20:26 AM              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 10 µl

Acq. Method     : D:\HPCHEM\1\METHODS\140154-01.M
Last changed    : 7/30/2015 3:44:44 PM by JAF
Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\140154-01.M
Last changed    : 4/19/2016 9:59:28 AM by CLG
                (modified after loading)
Method Info     : HPLC analytical method for cefesbuvir with H2O:4 mobile phase
=====
  
```



Area Percent Report

```

-----
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=260,4 Ref=260,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.834	BV	0.0814	8.47692	1.66545	0.0365
2	3.049	TV	0.0537	10.10554	2.75809	0.0436
3	3.158	VB	0.0674	66.67730	14.02912	0.2874
4	4.122	VB	0.0852	41.35081	6.58846	0.1782
5	4.523	BV	0.1575	37.63801	3.39154	0.1622
6	4.754	TV	0.1259	32.90162	3.69351	0.1418
7	4.995	VB	0.1252	32.78843	3.67072	0.1413
8	5.336	BB	0.1246	23.79929	2.81651	0.1026
9	9.756	BV	0.1838	2.25689e4	1883.67834	97.2728
10	12.909	VB	0.0635	379.01859	83.74574	1.8338

Totals : 2.32016e4 2006.03747

Imagen 98. Cromatograma HPLC del experimento R10A2 a los 30 minutos de reacción

15. Procesado del crudo de reacción

Transcurrido el tiempo establecido para el proceso, el aspecto del crudo de reacción es el de una suspensión de sólido blanquecino en un líquido de color ligeramente pálido, con parte de producto adherido a las paredes del reactor.

La mezcla de reacción se deja enfriar hasta temperatura ambiente, generalmente durante toda la noche, sin que ello conlleve cambios en la composición respecto del que se considera tiempo final de reacción.

A partir de este punto, se exploraron distintos procedimientos con el objetivo de recuperar la máxima cantidad de producto, y a la vez realizar operaciones unitarias útiles para ser transferidas a un futuro proceso industrial.

Así pues, considerando valores de conversión, solubilidad en las distintas fases y tamaño de partícula como principales factores a tener en cuenta, se diseñaron y pusieron a punto tres tipos de tratamiento del crudo de reacción, que se describen a continuación:

1. Metodología de *work-up* tipo 1 (ver Imagen 99)
2. Metodología de *work-up* tipo 2 (ver Imagen 100)
3. Metodología de *work-up* tipo 3 (ver Imagen 101)

Cada uno de ellos se representa gráficamente en forma de diagrama de flujo del proceso completo, incorporando datos de balance de masas y composición de las distintas fases. En cada caso se indica la reacción que se ha tomado como base de cálculo.

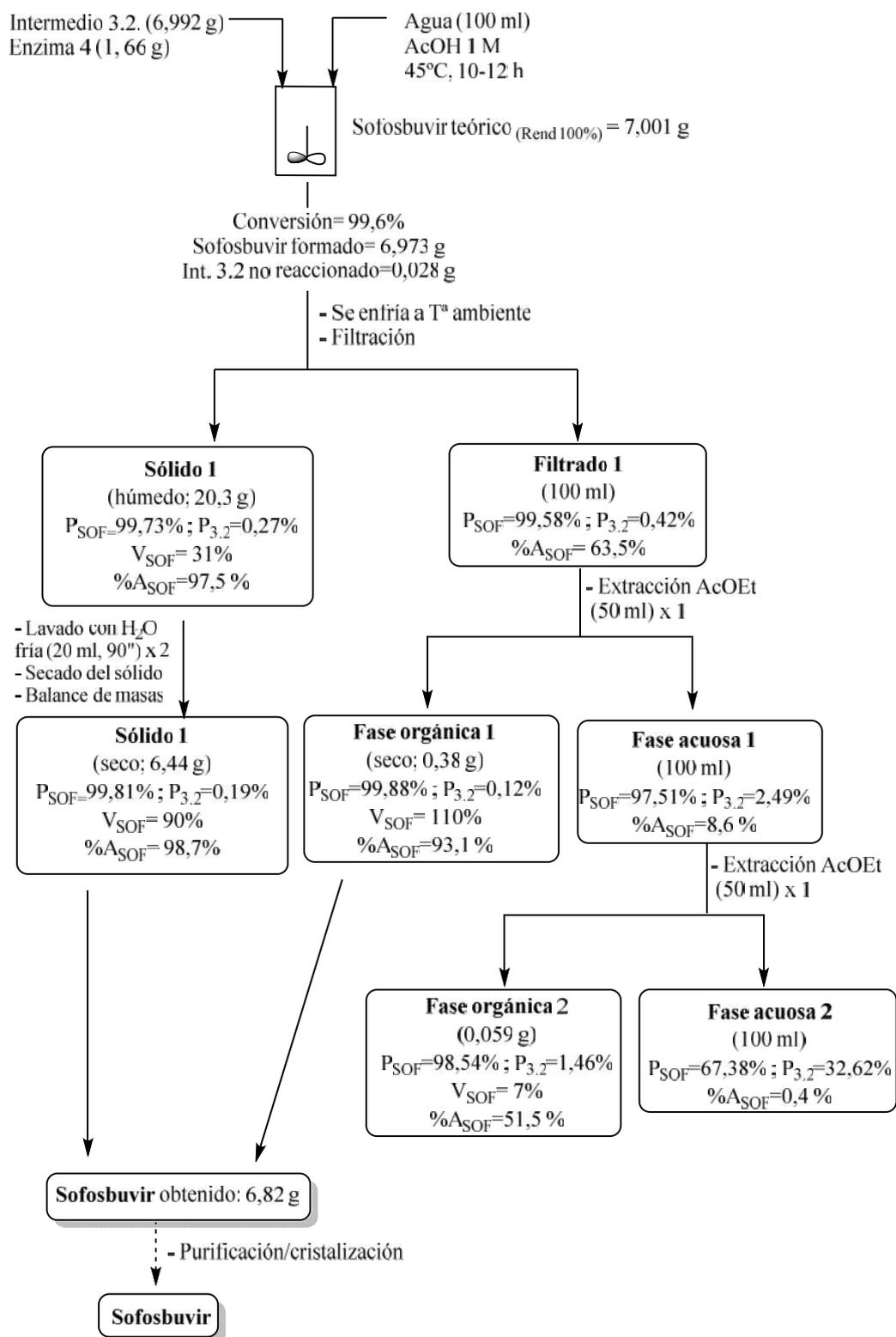


Imagen 99. Metodología de *work-up* tipo 1. Se ha tomado como referencia la reacción R9A35. P: porcentaje en peso relativo (sof/intermedio); V: Valoración (*assay*)

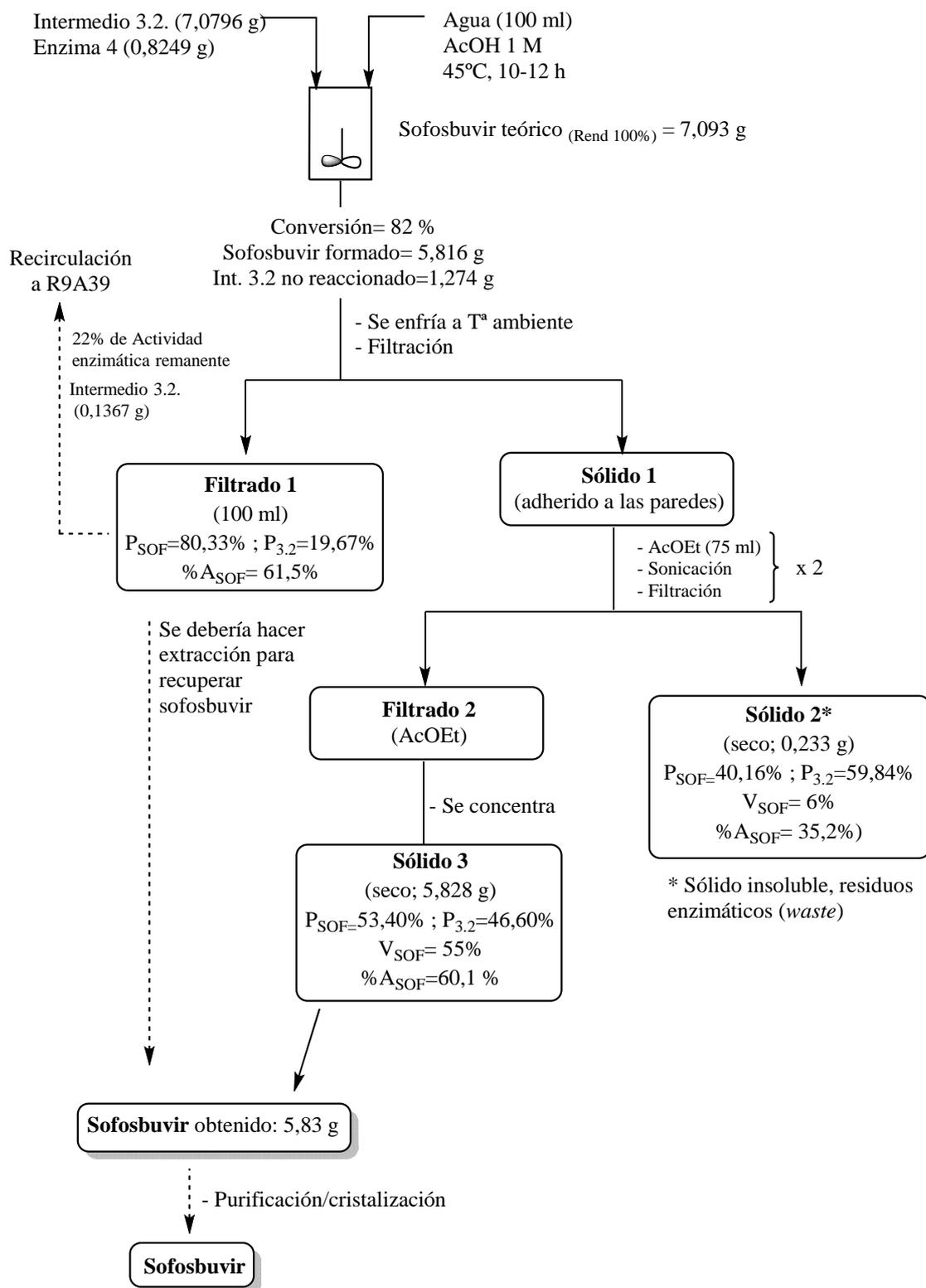


Imagen 100. Metodología de *work-up* tipo 2. Se ha tomado como referencia la reacción R9A38. P: porcentaje en peso relativo (sof/intermedio); V: Valoración (*assay*)

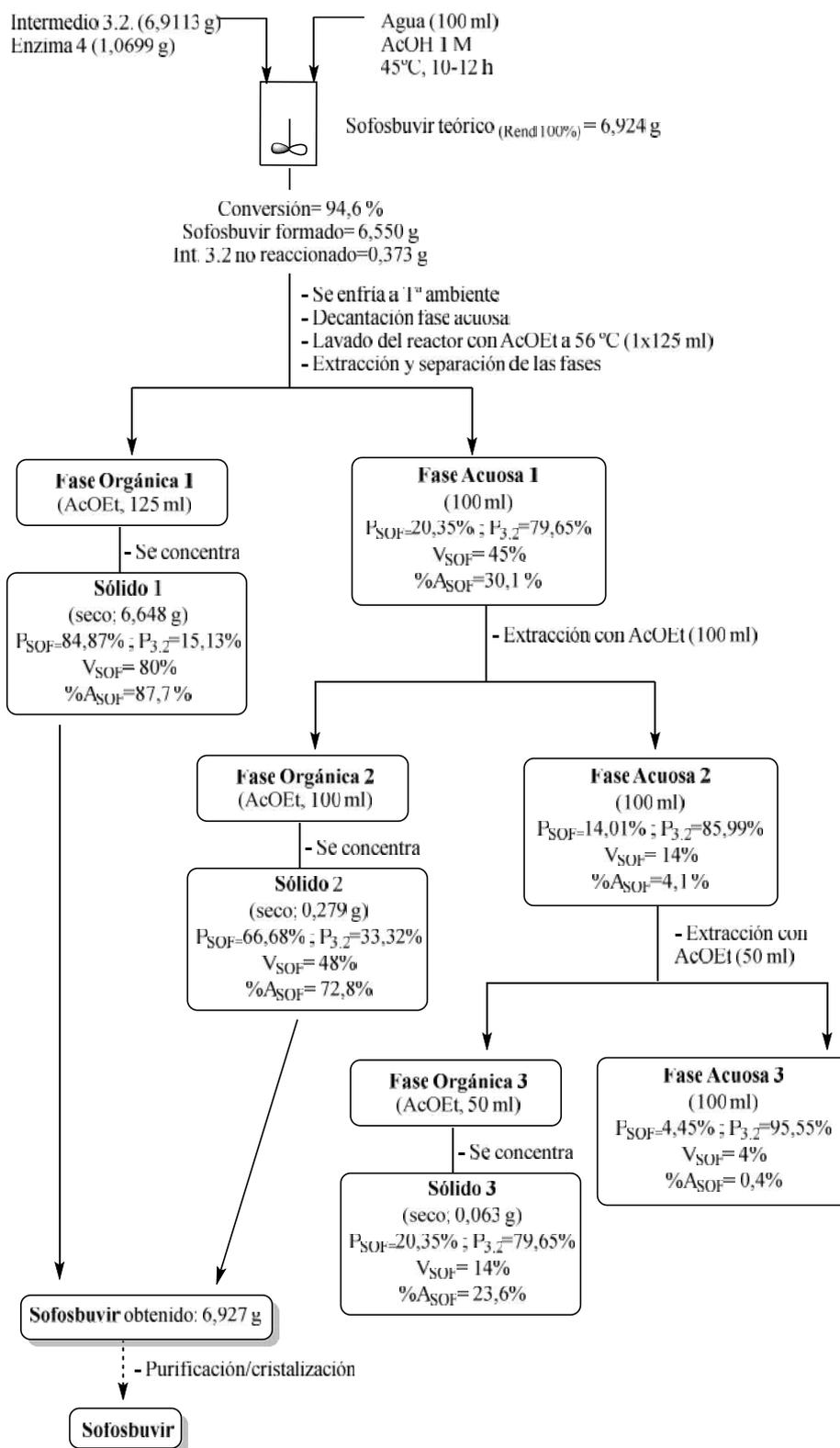


Imagen 101. Metodología de *work-up* tipo 3. Se ha tomado como referencia la reacción R9A41. P: porcentaje en peso relativo (sof/intermedio); V: Valoración (*assay*)

En las tres metodologías llevadas a cabo en este estudio, el disolvente orgánico utilizado, ya sea para lavar el precipitado formado durante la reacción como para realizar extracciones de

las aguas de reacción, fue AcOEt, seleccionado por la elevada solubilidad de sofosbuvir en este solvente (ver 12.6).

Se observó que la parte del precipitado insoluble en AcOEt permanece como un residuo blanco en el caso de los lavados, o como una interfase que contiene partículas de residuo blanco en el caso de las extracciones⁶⁵.

La metodología de *work-up* descrita en la Imagen 99 hace referencia a la reacción R9A35⁶⁶. En este caso, el aspecto del crudo de reacción al finalizar la reacción (un precipitado blanco totalmente dissociado sin nada de sólido adherido a las paredes), pudo ser directamente filtrado. La pureza del sólido lavado fue superior al 98,5% y corresponde a un 92% de rendimiento (sólido 1). Se alcanza el 97% de rendimiento si también se tiene en cuenta el producto sofosbuvir recuperado en la extracción con AcOEt (Fase Orgánica 1) de las aguas de reacción (en este caso filtrado 1).

La metodología de *work-up* descrita en la Imagen 100 hace referencia a la reacción R9A38. Debido al aspecto físico del precipitado formado, fue necesario lavar el reactor con AcOEt (por sonicación) y se filtró el residuo orgánico obtenido. En este caso, las aguas de reacción (filtrado 1) se recircularon para llevar a cabo una nueva reacción de desaminación.

La metodología de *work-up* descrita en la Imagen 101 hace referencia a la reacción R9A41. En este caso, se lavó el reactor con AcOEt con agitación mecánica y a temperatura (45-65 °C). El residuo orgánico obtenido se unió a las aguas de reacción y se llevó a cabo una extracción L-L, con dos extracciones adicionales con AcOEt. Se observa que prácticamente todo el sofosbuvir formado pasó a la fase orgánica, principalmente en la primera extracción.

Como resumen de este apartado, se observa que:

- La segunda metodología de *work-up* es la menos eficiente, aunque hay que tener en consideración que parte del producto se recircularizó junto con las aguas de reacción. Por otro lado, en este caso, la conversión de la reacción fue inferior a la de los otros dos ejemplos, por lo que este hecho debe tenerse en cuenta.
- El AcOEt es un disolvente ideal para extraer sofosbuvir de las aguas de reacción.
- En función de la forma física del precipitado obtenido, se han determinado dos metodologías que permiten recuperar el máximo de sofosbuvir del crudo de reacción.

⁶⁵ Este residuo se atribuyó al biocatalizador

⁶⁶ La conversión de intermedio 3.2 a sofosbuvir fue del 99,6% como ya se había descrito anteriormente

CONCLUSIONES

1. Se identificó un enzima capaz de reconocer sustratos nucleosídicos con sustituyentes voluminosos en 5', en contra de lo que se esperaba según estaba descrito en la bibliografía.
2. Se consiguió desarrollar un sistema de expresión FTO, compatible con su explotación industrial, para la producción del enzima.
3. Se probó en condiciones de PoC que este enzima es capaz de desaminar el precursor del sofosbuvir alcanzando conversiones cuantitativas sin mostrar ninguna inhibición y en tiempos compatibles con un proceso escalable.
4. Se consiguió la producción del biocatalizador en cultivo de alta densidad a escala de 5 litros, consiguiendo una cantidad suficiente de enzima para la producción de 4 kg de sofosbuvir.
5. Se consiguió desarrollar un método estandarizado para la evaluación del enzima.
6. El enzima se usó en diferentes formatos, siendo el formato liofilizado el que rindió un sólido con mejores características fisicoquímicas y presentando ventajas en el proceso y respecto a su conservación, transporte, almacenaje y utilización. Como contrapartida, la producción del enzima debería incorporar una etapa de liofilización que repercutiría en el coste del biocatalizador.
7. La sustitución del sistema de agitación magnético a sistema de agitación mecánica (tipo paleta teflonada retráctil) mejora el aspecto físico de la reacción y, a pesar de la heterogeneidad del sistema, permite conseguir una suspensión más homogénea.
8. Las pruebas de neutralización *in situ* del amoniaco formado en el medio, evitando la corrección del pH a lo largo de la reacción resultaron infructuosas.
9. En presencia de los disolventes orgánicos MeOH (cosolvente al 10% en agua) y AcOEt (sistema bifásico L-L en agua) el enzima no fue capaz de mantener su funcionalidad un período de tiempo suficiente para conseguir un adecuado progreso de la reacción.
10. Es posible recircular las aguas madres resultantes de la reacción en dos ciclos sucesivos, aprovechando así del orden de un 20% de la funcionalidad inicial del enzima.
11. La transformación de fragmento B-NH₂ a fragmento B por reacción de desaminación catalizada por el enzima EcoCDA desarrollado en este proyecto tiene lugar de manera cuantitativa y selectiva a un tiempo de reacción inferior a 0,5 h en las condiciones ensayadas, no optimizadas.

12. Se consiguió la producción de sofosbuvir, partiendo de su precursor aminado, con una conversión del 99,8 % en 10 horas de reacción obteniendo una productividad de 70 g/l de sofosbuvir y teniendo un control de las impurezas compatible con su calidad como API.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marcelino, L.; *et al.* Socio-problematization of Green Chemistry: Enriching systems thinking and social sustainability by education. *Sustainability*, **2019**, *11*, 7123.
2. Chandon, L. Do claims about the naturalness and dose of cosmetics ingredients affect the public's perception of their safety?. *Multidisciplinary Scientific Journal*, **2020**, *3*, 299-312.
3. Public attitudes to chemistry. *Royal Society of Chemistry, Research report TNS BMRB*, **2015**.
4. Pumarega, J.; *et al.* Citizens' perceptions of the presence and health risks of synthetic chemicals in food: results of an online survey in Spain. *Gaceta Sanitaria*, **2017**, *31* (5), 371-381.
5. Sharma, A.; *et al.* An Insight into chemicals toxicity in cosmetics and their health-related perceptions. *Annals of R.S.C.B.*, **2021**, *25* (3), 1773-1794.
6. Wilson, M. P.; Schwarzman, M. R. Toward a new U.S. chemicals policy: rebuilding the foundation to advance new science, green chemistry, and environmental health. *Environmental Health Perspectives*, **2009**, *117* (8), 1202-1209.
7. Wilson, M. P.; Schwarzman, M. R. Green chemistry: Wilson and Swarzman respond. *Environmental Health Perspectives (correspondence)*, **2009**, *117* (9), A386.
8. Omran, B.; Baek, K-H. Nanoantioxidants: pioneer types, advantages, limitations, and future insights. *Molecules*, **2021**, *26*, 7031.
9. Anastas, P.T.; Warner, J.C., Green Chemistry: Theory and Practice. *Oxford University Press*, **1998**, ISBN: 9780198502340.
10. Gal, J. The discovery of biological enantioselectivity: Louis Pasteur and the fermentation of tartaric acid, 1857-A review and analysis 150 years later. *Chirality*, **2008**, *20*, 5-19.
11. Jaenicke, L. Centenary of the award of a Nobel Prize to Eduard Buchner, the father of biochemistry in a test tube and thus of experimental molecular bioscience. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 6776-6782.
12. Bornscheuer, U.T.; *et al.* Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, **2012**, *485*, 185-194.
13. Reetz, M.T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. *Journal of the American Chemical Society*, **2013**, *135*, 12480-12496.
14. Koeller, K.M.; Wong, C-H. Enzymes for chemical synthesis. *Nature*, **2001**, *409*, 232-240.
15. Pollard, D.J.; Woodley, J.M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *TRENDS in Biotechnology*, **2006**, *25* (2), 66-73.
16. Deroncelé, V.M. Síntesis de clofarabina mediante el uso de nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas. *PhD thesis – UJI*, **2018**.
17. <https://www.fda.gov>

18. Kanda, Y.; *et al.* Two-phase synthesis of Taxol. *Journal of the American Chemical Society*, **2020**, *142* (23), 10526-10533.
19. Sin, G.; *et al.* Application of modeling and simulation tools for the evaluation of biocatalytic processes: a future perspective. *Biotechnology Progress*, **2009**, *25* (6), 1529-1538.
20. Tufvesson, P.; *et al.* Advances in the process development of biocatalytic process. *Organic Process Research & Development*, **2013**, *17*, 1233-1238.
21. Sanchez, S.; Demain, A.L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Organic Process Research & Development*, **2011**, *15* (1), 224-230.
22. Gurung, N.; *et al.* A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, **2013**, *Article ID 329121*, 1-18.
23. Singh, R.; *et al.* Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *Biotech*, **2016**, *6*:174, 1-15.
24. <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>
25. Tufvesson, P.; *et al.* Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food and Bioproducts Processing*, **2010**, *88*, 3-11.
26. Lee, D-C.; Kim, H-S. Optimization of a heterogeneous reaction system for the production of optically active D-amino acids using thermostable D-hydantoinase. *Biotechnology and Bioengineering*, **1998**, *60* (6), 729-738.
27. Tufvesson, P.; *et al.* Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. *Organic Process Research & Development*, **2011**, *15* (1), 266-274.
28. Tufvesson, P.; *et al.* Advances in the process development of biocatalytic process. *Organic Process Research & Development*, **2013**, *17*, 1233-1238.
29. Maervoet, V.E.T.; *et al.* Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering. *Organic Process Research & Development*, **2011**, *15*, 189-202.
30. Singh, R. Facts, growth, and opportunities in industrial biotechnology. *Organic Process Research & Development*, **2011**, *15* (1), 175-179.
31. Beg, Q.K.; *et al.* Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2001**, *56*, 326-338.
32. De Clercq, E. In search of a selective therapy of viral infections. *Antiviral research*, **2010**, *85*, 19-24.
33. Hung, S.W.; *et al.* Overcoming nucleoside analog chemoresistance of pancreatic cancer: a therapeutic challenge. *Cancer Letters*, **2012**, *320*, 138-149.

34. Koczor, C.A.; *et al.* The role of transporters in the toxicity of nucleoside and nucleotide analogs. *Expert Opinion Drug Metabolism and Toxicology*, **2012**, *8* (6), 665-676.
35. Galmarini, C.M.; *et al.* Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *THE LANCET Oncology*, **2002**, *3*, 415-424.
36. Sampath, D.; *et al.* Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene*, **2003**, *22*, 9063-9074.
37. Seley-Radtke, K.L.; Yates, M.K. The evolution of nucleoside analogue antivirals: a review for chemists and non-chemists. Part 1: early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Research*, **2018**, *154*, 66-86.
38. Yates, M.K.; Seley-Radtke, K.L. The evolution of antiviral nucleoside analogues: a review for chemists and non-chemists. Part II: complex modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Research*, **2019**, *162*, 5-21.
39. Eastman, R.T.; *et al.* Remdesivir: a review of its discovery and development leading to emergency use authorization for treatment of COVID-19. *ACS Central Science*, **2020**, *6*, 672-683.
40. Bassetto, M.; *et al.* Novel nucleoside analogues as effective antiviral agents for Zika virus infections. *Molecules*, **2020**, *25*, 4813.
41. Tsesmetzis, N.; *et al.* Nucleobase and nucleoside analogues: resistance and re-sensitisation at the level of pharmacokinetics, pharmacodynamics and metabolism. *Cancers*, **2018**, *10*, 240.
42. Seley-Radtke, K.L.; *et al.* Broad spectrum antiviral nucleosides – Our best hope for the future. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, **2021**, *Volume 57, Chapter 3*, 109-132.
43. Feldman, A.W.; *et al.* A tool for the import of natural and unnatural nucleoside triphosphates into bacteria. *Journal of the American Chemical Society*, **2018**, *140*(4), 1447-1454.
44. Magdalena, J.; *et al.* Synthesis of novel carbazol linked pyrimidine-pyrimidine and pyrimidine-purine dinucleotide analogues. *Tetrahedron Letters*, **1999**, *40*, 1787-1790.
45. Nakamura, M.; *et al.* Sofosbuvir treatment and hepatitis C virus infection. *World Journal of Hepatology*, **2016**, *8*(3), 183-190.
46. Rolland, S.; Vachon, M-L. Sofosbuvir for the treatment of hepatitis C virus infection. *CMAJ*, **2015**, *187*(3), 203-204.
47. <https://www.drugs.com/medical-answers/sovaldi-cure-hepatitis-3538386/>
48. Shehadeh, F.; *et al.* Efficacy and safety of sofosbuvir in the treatment of hep C among patients on hemodialysis: a systematic review and meta-analysis. *Nature Scientific Reports*, **2020**, *10*:14332.

49. Huhn, G.D.; *et al.* HIV/HCV therapy with ledipasvir/sofosbuvir after randomized switch to emtricitabine-tenofovir alafenamide-based single-tablet regimens. *PLOS ONE*, **2020**, *15*(1), e0224875.
50. Hori, N.; *et al.* Production of 5-methyluridine by immobilized thermostable purine nucleoside phosphorylase and pyrimidine nucleoside phosphorylase from *Bacillus stearothermophilus* JST 859. *Journal of Biotechnology*, **1991**, *17*, 121-131.
51. Caton-Williams, J.; *et al.* Protection-free one-pot synthesis of 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates and DNA polymerization. *Organic Letters*, **2011**, *13* (16), 4156-4159.
52. Li, N.; *et al.* Biocatalytic transformation of nucleoside derivatives. *Biotechnology Advances*, **2010**, *28*, 348-366.
53. Taverna-Porro, M.; *et al.* Chemoenzymatic preparation of nucleosides from furanoses. *Tetrahedron Letters*, **2008**, *49*, 2642-2645.
54. Díaz-Rodríguez, A.; *et al.* Novel and efficient regioselective enzymatic approach to 3'-, 5'- and 3',5'-di-*O*-crotonyl 2'-deoxynucleoside derivatives. *Tetrahedron Letters*, **2005**, *46*, 5835-5838.
55. Araki, T.; *et al.* Method for producing cytosine nucleoside compounds. European Patent Application, **2002**, EP1254959A2.
56. Patel, R.N. (Editor). Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries. *CRC Press*, **2006**, ISBN: 9780367446284.
57. Li, N.; *et al.* Biocatalytic transformation of nucleoside derivatives. *Biotechnology Advances*, **2010**, *28*, 348-366.
58. Zhu, S.; *et al.* Two-step efficient synthesis of 5-methyluridine via two thermostable nucleoside phosphorylase from *Aeropyrum pernix*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2012**, *22*, 2102-2104.
59. Van Draanen, N.A.; *et al.* Synthesis and antiviral activity of 2'-deoxy-4'-thio purine nucleosides. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1996**, *39* (2), 538-542.
60. Zhu, S.; *et al.* Biosynthesis of nucleoside analogues via thermostable nucleoside phosphorylase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2013**, *97*, 6769-6778.
61. Fernández-Lucas, J.; *et al.* Enzymatic synthesis of nucleoside analogues using immobilized 2'-deoxyribosyltransferase from *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2011**, *91*, 317-327.
62. 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*, **2013**, *97*, 3773-3785.

63. Almendros, M.; *et al.* Thermus thermophilus nucleoside phosphorylases active in the synthesis of nucleoside analogues. *Applied and Environmental Microbiology*, **2012**, *78* (9), 3128-3135.
64. Fernández-Lucas, J.; *et al.* Magnetic chitosan beads for covalent immobilization of 2'-deoxyribosyltransferase: application in nucleoside analogues synthesis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2013**, *40* (9), 955-966.
65. Fernández-Lucas, J.; *et al.* One-step enzymatic synthesis of nucleosides from low water-soluble purine bases in non-conventional media. *Bioresource Technology*, **2012**, *115*, 63-69.
66. De Benedetti, E.C.; *et al.* Biotransformation of 2,6-diaminopurine nucleosides by immobilized Geobacillus stearothermophilus. *Biotechnology Progress*, **2012**, *28* (5), 1251-1256.
67. Liang, S.; *et al.* Enzymatic synthesis of 2'-deoxyadenosine and 6-methylpurine-2'-deoxyriboside by Escherichia coli DH5 α overexpressing nucleoside phosphorylases from Escherichia coli BL21. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2010**, *110* (2), 165-168.
68. Visser, D.F.; *et al.* Stabilization of Escherichia coli uridine phosphorylase by evolution and immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2011**, *68*, 279-285.
69. Fateev, I.V.; *et al.* Recognition of artificial nucleobases by E. coli purine nucleoside phosphorylase versus its Ser90Ala mutant in the synthesis of base-modified nucleosides. *Chemistry European Journal*, **2015**, *21*, 13401-13419.
70. Fernández-Lucas, J.; *et al.* Low temperature synthesis of 2'-deoxyadenosine using immobilized psychrotrophic microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, **2007**, *100* (2), 213-222.
71. Alberty, R.A. Thermodynamic properties of enzyme-catalyzed reactions involving cytosine, uracil, thymine, and their nucleosides and nucleotides. *Biophysical Chemistry*, **2007**, *127*, 91-96.
72. Chuvikovskiy, D.V.; *et al.* Ribokinase from E. coli: Expression, purification, and substrate specificity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2006**, *14*, 6327-6332.
73. Miyamoto, Y.; *et al.* Characterization of N-deoxyribosyltransferase from Lactococcus lactis subsp. lactis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, *1774*, 1323-1330.
74. Huard, C.; Hutchinson, D.W. The beneficial effect of organic solvents on the enzymatic synthesis of nucleoside analogues using N-deoxyribosyltransferases from Lactobacillus leichmannii (E.C. 2.4.2.6). *Biocatalysis*, **1992**, *6*, 201-210.
75. Kaminski, P.A.; Labesse, G. Phosphodeoxyribosyltransferases, designed enzymes for deoxyribonucleotides synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **2013**, *288* (9), 6534-6541.

76. Hatano, A.; *et al.* Importance of 3'-hydroxyl group of the nucleosides for the reactivity of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli*. *Chemistry Letters*, **2006**, 35 (2), 232-233.
77. Usova, E.; *et al.* Human Deoxycytidine kinase as a deoxyribonucleoside phosphorylase. *Journal of Molecular Biology*, **2004**, 344, 1347-1358.
78. Zhou, X.; *et al.* Recombinant purine nucleoside phosphorylases from thermophiles: preparation, properties and activity towards purine and pyrimidine nucleosides. *FEBS Journal*, **2013**, 280 (6), 1475-1490.
79. Fernández-Lucas, J.; *et al.* 2'-deoxyribosyltransferases: an efficient biocatalyst for the synthesis of nucleoside analogues. *10th Green Chemistry Conference*, **2013**.
80. Fresco-Taboada, A.; *et al.* Genome of the psychrophilic bacterium *Bacillus psychrosaccharolyticus*, a potential source of 2'-deoxyribosyltransferase for industrial nucleoside synthesis. *Genome Announcements*, **2013**, 1 (3), 1-2.
81. Szeker, K.; *et al.* High-temperature cultivation and 5' mRNA optimization are key factors for the efficient overexpression of thermostable *Deinococcus geothermalis* purine nucleoside phosphorylase in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, **2011**, 156, 268-274.
82. Hori, N.; *et al.* The effects of organic solvent on the ribosyl transfer reaction by thermostable purine nucleoside phosphorylase and pyrimidine nucleoside phosphorylase from *Bacillus stearothermophilus* JTS 859. *Biocatalysis*, **1991**, 4, 297-304.
83. Smar, M.; *et al.* Lyase activity of nucleoside 2-deoxyribosyltransferase: transient generation of ribal and its use in the synthesis of 2'-deoxynucleotides. *Biochemistry*, **1991**, 30, 7908-7912.
84. Szeker, K.; *et al.* Comparative investigations on thermostable pyrimidine nucleoside phosphorylases from *Geobacillus thermoglucosidasius* and *Thermus thermophilus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2012**, 84, 27-34.
85. Weiss, N.; *et al.* *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus bulgaricus*, subjective synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and description of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **1983**, 4, 552-557.
86. Fernández-Lucas, J.; *et al.* *Lactobacillus reuteri* 2'-deoxyribosyltransferase, a novel biocatalyst for tailoring of nucleosides. *Applied and Environmental Microbiology*, **2010**, 76 (5), 1462-1470.
87. Miyamoto, Y.; *et al.* Characterization of N-deoxyribosyltransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, 1774, 1323-1330.

88. Almendros, M.; *et al.* Thermus thermophilus strains active in purine nucleoside synthesis. *Molecules*, **2009**, *14*, 1279-1287.
89. Kaminski, P.A.; *et al.* Expanding substrate specificity of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase. *Nucleic Acids Symposium Series*, **2008**, *52*, 495-496.
90. Pugmire, M.J.; Ealick, S.E. Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochemistry Journal*, **2002**, *361*, 1-25.
91. Konrad, A.; *et al.* The evolution of catalytic residues and enzyme mechanism within the bacterial nucleoside phosphorylase superfamily 1. *Gene*, **2012**, *510*, 154-161.
92. Wang, T.P.; *et al.* Enzymatic deamination of cytosine nucleosides. *Journal of Biological Chemistry*, **1950**, *184*, 17-28.
93. Porter, D.J.T.; *et al.* Identification of the active site nucleophile in nucleoside 2-deoxyribosyltransferase as glutamic acid 98. *Journal of Biological Chemistry*, **1995**, *270* (26), 15551-15556.
94. Short, S.A.; *et al.* Active site amino acids that participate in the catalytic mechanism of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, **1996**, *271* (9), 4978-1987.
95. Porter, D.J.T.; Short, S.A. Nucleoside 2-deoxyribosyltransferase. Pre-steady-state kinetic analysis of native enzyme and mutant enzyme with an alanyl residue replacing glu-98. *Journal of Biological Chemistry*, **1995**, *270* (26), 15557-15562.
96. Visser, D.F.; *et al.* Cloning, purification and characterization of a recombinant purine nucleoside phosphorylase from Bacillus halodurans Alk36. *Extremophiles*, **2010**, *14*, 185-192.
97. Mikhailopulo, I.A.; Miroshnikov, A.I. Biologically important nucleosides: modern trends in biotechnology and application. *Mendeleev Communications*, **2011**, *21*, 57-68.
98. Martínez-Montero, S.; *et al.* Synthesis, evaluation of anti-HIV-1 and anti-HCV activity of novel 2'.3'-dideoxy-2',2'-difluoro-4'-azanucleosides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2012**, *20*, 6885-6893.
99. Mikhailopulo, I.A.; Miroshnikov, A.I. New trends in nucleoside biotechnology. *Acta Naturae*, **2010**, *2* (2), 36-58.
100. Freeman, G.A.; *et al.* 2-Amino-9-(3-azido-2,3-dideoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-6-substituted-9H-purines: synthesis and anti-HIV activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **1995**, *3* (4), 447-458.
101. Fernández-Lucas, J.; *et al.* Biochemical and structural studies of two tetrameric nucleoside 2'-deoxyribosyltransferases from psychrophilic and mesophilic bacteria:

- insights into cold-adaptation. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2021**, *192*, 138-150.
102. Acosta, J.; *et al.* Taylor-made production of pyrimidine nucleoside-5'-monophosphate analogues by highly stabilized mutant uracil phosphoribosyltransferase from *Toxoplasma gondii*. *Bioresource Technology*, **2021**, *339*, 125649.
103. Del Arco, J.; *et al.* New trends in the biocatalytic production of nucleosidic active pharmaceutical ingredients using 2'-deoxyribosyltransferases. *Biotechnology Advances*, **2021**, *51*, 107701.
104. Fernández-Lucas, J. Biotechnological and biomedical applications of enzymes involved in the synthesis of nucleosides and nucleotides. *Biomolecules*, **2021**, *11*, 1147.
105. Rivero, C.W.; *et al.* Green production of cladribine by using immobilized 2'-deoxyribosyltransferase from *Lactobacillus delbrueckii* stabilized through a double covalent/entrapment technology. *Biomolecules*, **2011**, *11*, 657.
106. Sinisterra, J.V.; *et al.* Method for the synthesis of nucleosides using psychrotolerant or psychrotrophic micro-organisms. WO 2005/116232 A1.
107. Fateev, I.V.; *et al.* The chemoenzymatic synthesis of clofarabine and related 2'-deoxyfluoroarabinosyl nucleosides: the electronic and stereochemical factors determining substrate recognition by *E. coli* nucleoside phosphorylases. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **2014**, *10*, 1657-1669.
108. Sun, Z.; *et al.* Nondestructive enzymatic deamination enables single-molecule long-read amplicon sequencing for the determination of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Genome Research*, **2021**, *31*, 1-10.
109. Kamat, S.S.; *et al.* Enzymatic deamination of the epigenetic base N-6-methyladenine. *Journal of the American Chemical Society*, **2011**, *133*, 2080-2083.
110. Scarano, E.; *et al.* Enzymatic deamination of 5-deoxycytidylic acid and of 5-methyl-5'-deoxycytidylic acid in growing and in non-growing tissues. *Nature*, **1960**, *186*, 237-238.
111. Sambrook, J. Molecular Cloning – A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **2001**. Protocol 25. Preparation and transformation of Competent *E. coli* using calcium chloride. 1.116

ANEXOS

Anexo 1. Tabla resumen de las reacciones de síntesis

Reacción	T° (°C)	[Intermedio 3.2] (mM)	[Intermedio 3.2] (g/l)	Solvente de reacción	pH solvente de reacción	Vrx (ml)	Lote Enzima	Enzima (eq)	Volumen ácido acético añadido (ml)	Conversión (%)	Tiempo de rx del valor de conversión (h)	Sofosbuvir formado (g/l)
R9-PoCa	37	7,4	3,9	Fosfato 30mM	7,09	4,0	150417	1,0	-	97,7	29	3,8
R9-PoCb	37	7,4	3,9	Fosfato 30mM	7,09	4,0	150417	1,0	-	97,8	29	3,8
R9A1	37	27,8	14,7	Fosfato 30mM	7,09	4,1	150417	1,0	-	88,9	22,5	13,1
R9A2	37	21,1	11,1	Fosfato 30mM	7,09	4,1	150417	1,0	-	93,4	22,5	10,4
R9A3	37	27,1	14,3	Fosfato 30mM	7,09	4,2	150417	2,0	-	96,5	22,5	13,8
R9A4	37	20,5	10,8	Fosfato 30mM	7,09	4,2	150417	2,0	-	98,2	22,5	10,6
R9A5	37	26,4	13,9	Fosfato 30mM	7,09	4,3	150417	2,6	-	97,6	22,5	13,6
R9A6	37	26,0	13,7	Fosfato 30mM	7,09	4,4	150417	3,1	-	97,5	22,5	13,4
R9A7	45,5	39,9	21,1	Fosfato 30mM	7,09	4,2	150417	1,0	-	93,6	22,5	19,8
R9A8	45,5	38,2	20,2	Fosfato 30mM	7,09	4,4	150417	2,0	-	94,4	22,5	19,1
R9A9	45,5	37,5	19,8	Fosfato 30mM	7,09	4,5	150417	2,6	-	91,7	22,5	18,2
R9A10	45,5	36,6	19,4	Fosfato 30mM	7,09	4,6	150417	3,1	-	92,1	22,5	17,9
R9A11	37	27,5	14,5	H ₂ O	7,14	4,1	150417	1,0	-	91,4	22,5	13,3
R9A12	37	27,6	14,6	NH ₄ HCC ₃ 30mM	6,99	4,1	150417	1,0	-	88,7	22,5	13,0
R9A13	37	28,5	15,1	Fosfato 30mM	7,09	4,1	150417	0,5	-	94,4	43	14,2
R9A14	37	28,0	14,8	Fosfato 30mM	7,09	4,1	150417	0,8	-	93,4	43	13,8
R9A15	46	39,8	21,0	H ₂ O	7,14	4,2	150417	1,0	-	88,1	22,33	18,5
R9A16	46	37,3	19,7	H ₂ O	7,14	4,5	150417	2,6	-	91,5	22,33	18,1
R9A17	46	36,6	19,4	H ₂ O	7,14	4,6	150417	3,1	-	90,4	22,33	17,5
R9A18	46	46,3	24,5	H ₂ O	7,14	4,7	150417	3,1	-	93,4	22,25	22,9
R9A19	46	67,7	35,8	H ₂ O	7,14	5,2	150417	3,1	-	89,9	22,25	32,2
R9A20	46	73,1	38,6	H ₂ O	7,14	4,8	150417	2,0	-	97,2	46	37,6
R9A21	46	101,5	53,6	H ₂ O	7,14	5,2	150417	2,0	-	85,7	46	46,1
R9A22	46	125,8	66,5	H ₂ O	7,14	5,5	150417	2,0	-	91,8	46	61,2

Reacción	T* (°C)	[Intermedio 3.2] (mM)	[Intermedio 3.2] (g/l)	Solvente de reacción	pH solvente de reacción	Vrx (ml)	Lote Enzima	Enzima (eq)	Volumen ácido acético añadido (ml)	Conversión (%)	Tiempo de rx del valor de conversión (h)	Sofosbuvir formado (g/l)
R9A23	45	26,7	14,1	H ₂ O	7,14	53,2	150417	2,1	-	99	24,5	14,0
R9A24	45	28,5	15,1	H ₂ O	7,08	79,8	150417	2,0	1,8	97,9	7,5	14,8
R9A25	45	41,6	22,0	H ₂ O	7,14	4,0	150417	0,5	-	77,6	24	17,1
R9A26	45	40,5	21,4	H ₂ O	7,14	4,1	150417	1,1	-	91,1	24	19,6
R9A27	45	42,2	22,3	H ₂ O	7,14	4,0	150417	1,0	-	87,0	24	19,0
R9A28	45	42,2	22,3	H ₂ O	7,14	4,0	150417	2,0	-	90,1	24	20,2
R9A29	45	28,5	15,1	H ₂ O	6,92	79,8	150417	2,0	2,1	98,3	7,5	14,8
R9A30	45	28,5	15,0	H ₂ O	7,01	80,0	150417	2,0	2,0	99,1	7,5	14,9
R9A31	45	41,6	22,0	H ₂ O	7,08	80,1	150417	1,1	2,6	88,4	7,5	19,5
R9A32	45	167,8	88,7	H ₂ O	7,09	79,7	150417	1,0	9,6	85,8	7,5	76,2
R9A33	45	132,6	70,1	H ₂ O	7,71	100,0	Extracto 05-USP12-P01	1,0	12,3	94,1	11,0	66,1
R9A34	45	133,2	70,4	H ₂ O	7,09	99,8	Extracto 05-USP12-P01	1,0	11,6	85,8	11,5	60,5
R9A35	45	132,3	69,9	H ₂ O	7,09	100,0	Liófilo 1 05 USP12-P01	1,0	12,8	99,6	10,1	69,8
R9A36	45	132,2	69,0	H ₂ O/MeOH 90/10	7,09	100,0	Liófilo-2 05-USP12-P01	1,0	0,0	5,1	5,0	3,6
R9A37	45	133,4	70,5	H ₂ O/AcOH 50/50	7,09	200,0	Liófilo-2 05-USP12-P01	1,0	0,4	2,7	4,8	1,9
R9A38	45	134,0	70,8	H ₂ O	7,09	100,0	Liófilo 2 05 USP12-P01	1,0	7,0	82,0	11,9	58,2
R9A39	45	129,0	60,6	H ₂ O	7,02	100,0	Liófilo-2 05-USP12-P01	1,0	0,6	76,2	6,6	52,4
R9A40	45	134,0	70,8	H ₂ O	7,34	100,0	Liófilo-2 05-USP12-P01	1,2	6,5	58,9	11,5	41,8
R9A41	45	130,8	69,1	H ₂ O	7,00	100,0	Liófilo-2 05-USP12-P01	1,2	10,4	94,6	11,9	65,5

Anexo 2. Portada de la patente aprobada en Europa



(11) **EP 3 271 468 B1**

(12) **EUROPEAN PATENT SPECIFICATION**

(45) Date of publication and mention of the grant of the patent:
06.11.2019 Bulletin 2019/45

(51) Int Cl.:
C12P 19/30 ^(2006.01) **C12P 9/00** ^(2006.01)
C12P 17/16 ^(2006.01) **C07H 19/06** ^(2006.01)
C07H 19/10 ^(2006.01) **C07H 19/12** ^(2006.01)

(21) Application number: **16712777.8**

(86) International application number:
PCT/EP2016/055939

(22) Date of filing: **18.03.2016**

(87) International publication number:
WO 2016/146808 (22.09.2016 Gazette 2016/38)

(54) **DEAMINATION OF ORGANOPHOSPHORUS-NUCLEOSIDES**
DESAMINIERUNG VON ORGANOPHOSPHOR-NUKLEOSIDEN
DÉSAMINATION DE NUCLÉOSIDES ORGANOPHOSPHORÉS

(84) Designated Contracting States:
AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR

(74) Representative: **Ponti & Partners, S.L.P**
C. de Consell de Cent 322
08007 Barcelona (ES)

(30) Priority: **19.03.2015 EP 15382131**
07.08.2015 EP 15382419

(56) References cited:
WO-A2-2012/158811

(43) Date of publication of application:
24.01.2018 Bulletin 2018/04

(73) Proprietor: **Institut Univ. de Ciència i Tecnologia, S.A.**
08100 Mollet del Vallès Barcelona (ES)

(72) Inventors:
• **PÉREZ OZCÁRIZ, Sergio**
08100 Mollet Del Valles (ES)
• **PASCUAL GILABERT, Marta**
08100 Mollet Del Vallès (ES)
• **ALONSO FERNÁNDEZ, Javier**
08100 Mollet Del Vallès (ES)
• **LÓPEZ GÓMEZ, Cristina**
08100 Mollet Del Vallès (ES)
• **FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Carmen Maria**
08100 Mollet Del Valles (ES)
• **CASTELLS BOLIART, Josep**
08100 Mollet Del Valles (ES)

- **S. EMMANUELLE FAIVRE-NITSCHKE ET AL: "A prokaryotic-type cytidine deaminase from Arabidopsis thaliana . Gene expression and functional characterization", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 263, no. 3, August 1999 (1999-08), pages 896-903, XP055243283, GB ISSN: 0014-2956, DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00591.x cited in the application**
- **A VITA ET AL: "Cytidine deaminase from Escherichia coli B. Purification and enzymatic and molecular properties", BIOCHEMISTRY, vol. 24, no. 21, 8 October 1985 (1985-10-08), pages 6020-6024, XP055242599, US ISSN: 0006-2960 cited in the application**
- **TOHORU KATSURAGI ET AL: "Cytosine Deaminase from Escherichia coli-Production, Purification, and Some Characteristics", AGRIC. BIOL. CHEM., vol. 50, no. 7, 1986, pages 1721-1730, XP001317698, cited in the application**

Note: Within nine months of the publication of the mention of the grant of the European patent in the European Patent Bulletin, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to that patent, in accordance with the Implementing Regulations. Notice of opposition shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).

Anexo 3. Portada de la patente aprobada en China

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107849594 B

(45) 授权公告日 2022.01.18

(21) 申请号 201680028204.3	J·卡斯泰尔斯波利亚特
(22) 申请日 2016.03.18	(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 107849594 A	代理人 张拥 田婕
(43) 申请公布日 2018.03.27	(51) Int.Cl.
(30) 优先权数据 15382131.9 2015.03.19 EP 15382419.8 2015.08.07 EP	C12P 19/30 (2006.01) C12P 9/00 (2006.01) C12P 17/16 (2006.01) C07H 19/06 (2006.01) C07H 19/10 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2017.11.15	(56) 对比文件
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2016/055939 2016.03.18	WO 0168806 A2,2001.09.20 CN 1071577 A,1993.05.05 WO 2007020193 A2,2007.02.22 WO 2012158811 A3,2013.02.28
(87) PCT国际申请的公布数据 W02016/146808 EN 2016.09.22	刘洋 等.核苷类抗肿瘤药物研究进展.《中国新药杂志》.2012, Luis E. Iglesias 等.Biocatalytic approaches applied to the synthesis of nucleoside prodrugs.《Biotechnology Advances》.2015,
(73) 专利权人 科技学专业学院有限公司 地址 西班牙摩勒德尔瓦勒斯	审查员 周振威
(72) 发明人 S·佩雷斯奥兹卡里兹 M·帕斯卡尔吉拉波特 J·阿朗索费尔南德斯 C·洛佩兹戈麦兹 C·M·费尔南德斯费尔南德斯	权利要求书7页 说明书32页

(54) 发明名称

有机磷-核苷的脱氨基

(57) 摘要

