

Tesis de Posgrado

Síntesis quimio-enzimática de nucleósidos naturales y modificados

Taverna Porro, Marisa Lía

2010

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Orgánica de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Taverna Porro, Marisa Lía. (2010). Síntesis quimio-enzimática de nucleósidos naturales y modificados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4590_TavernaPorro.pdf

Cita tipo Chicago:

Taverna Porro, Marisa Lía. "Síntesis quimio-enzimática de nucleósidos naturales y modificados". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4590_TavernaPorro.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

BIBLIOTECA CENTRAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES / USA



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Orgánica

SÍNTESIS QUIMIO-ENZIMÁTICA DE NUCLEÓSIDOS NATURALES Y MODIFICADOS

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Química Orgánica

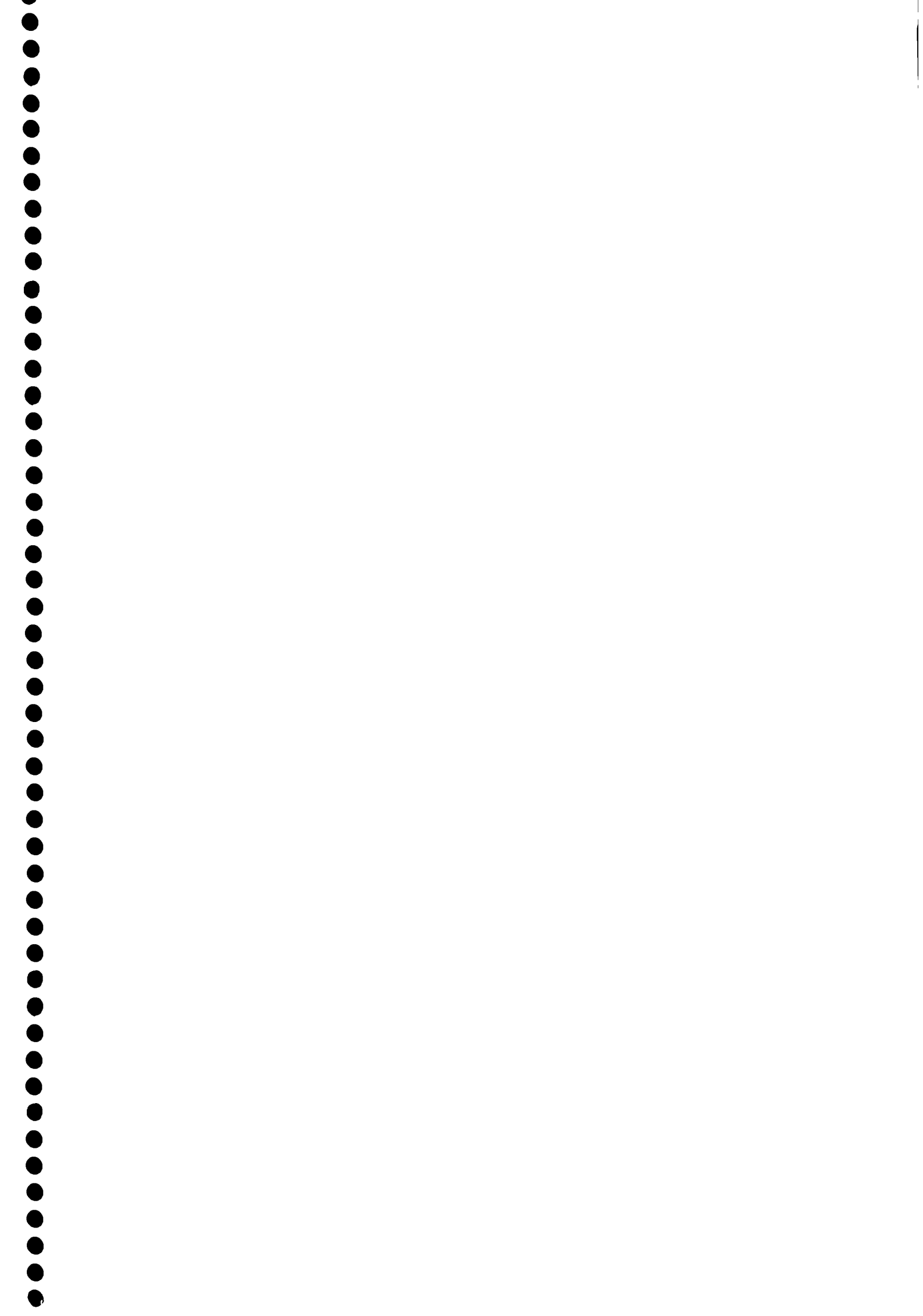
Lic. Marisa Lía Taverna Porro

79581

Director de tesis: Dr. Javier Montserrat
Director asistente: Dr. Adolfo Iribarren
Consejero de estudios: Dr. Gerardo Burton

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
(INGEBI), CONICET-UBA

Buenos Aires, 2010

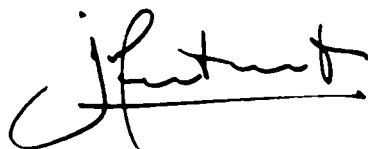


Los abajo firmantes

Certificamos:

Que la Licenciada Marisa Lía Taverna Porro, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo que con el título: "**Síntesis quimio-enzimática de nucleósidos naturales y modificados**", presenta en esta memoria y que constituye su Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Orgánica

Y para que conste a los efectos oportunos, presentamos a la Universidad de Buenos Aires la mencionada Tesis, firmando el presente certificado



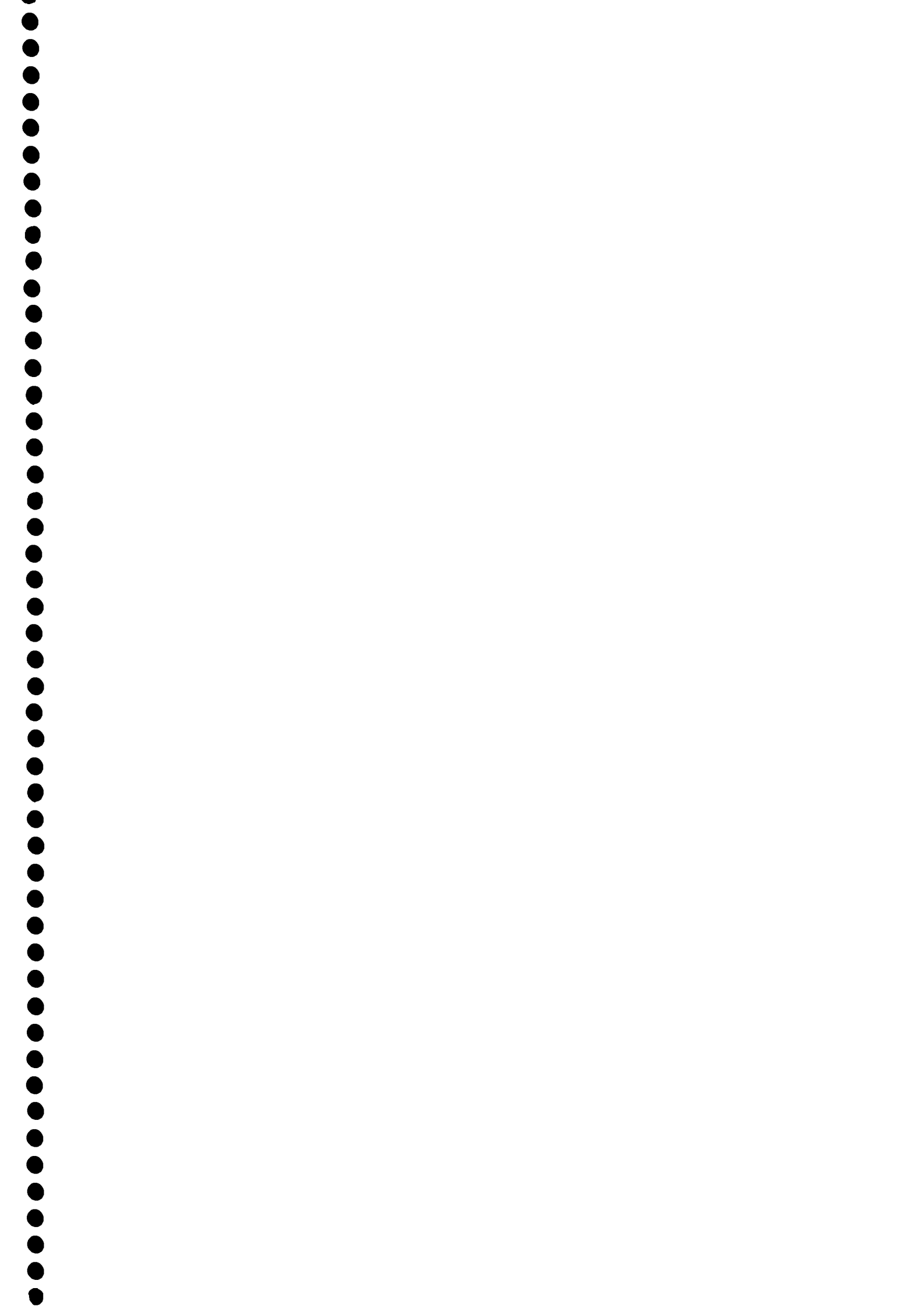
Dr. Javier Montserrat



Dr. Adolfo Iribarren

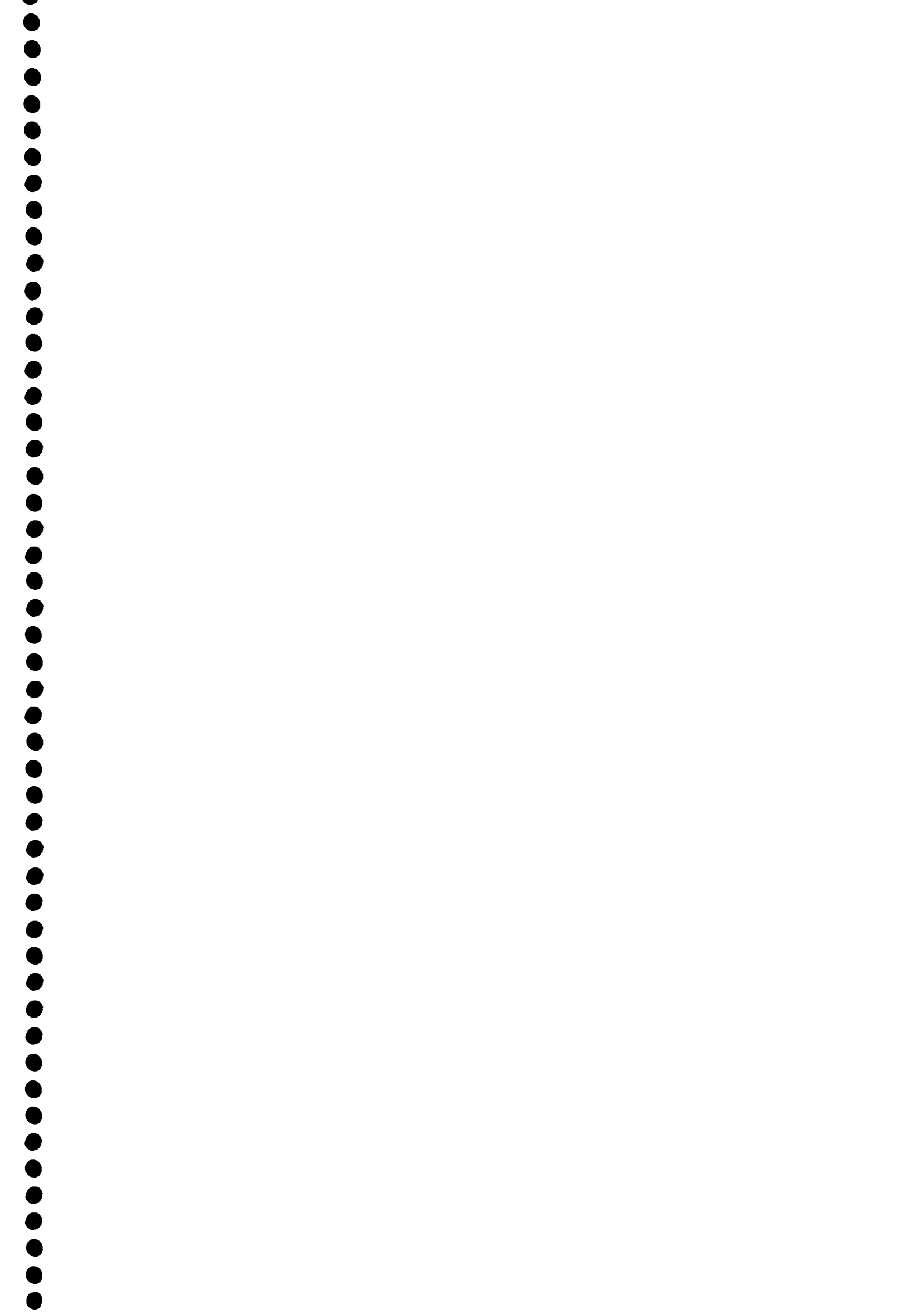


MARISA LIÁ TAVENA PORRO





A mi familia y amigos



SÍNTESIS QUIMIO-ENZIMÁTICA DE NUCLEÓSIDOS NATURALES Y MODIFICADOS

Este trabajo de tesis presenta una estrategia versátil y económica para la síntesis de nucleósidos tanto naturales como modificados partiendo de azúcares naturales. La aproximación quimio-enzimática de la síntesis de nucleósidos que se exploró, se encuentra resumida en la **Figura 1**.

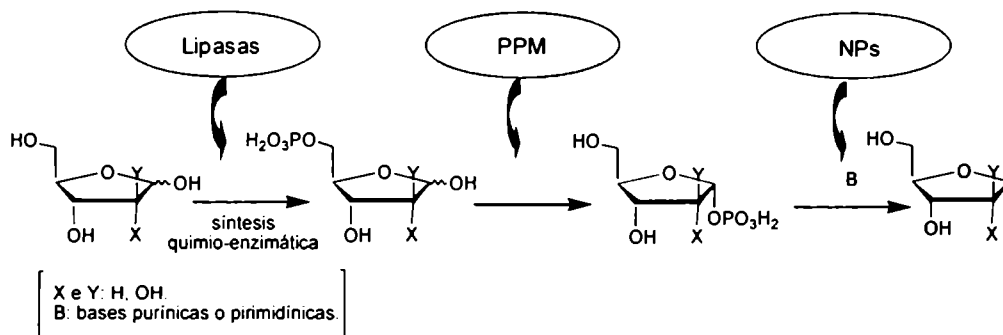


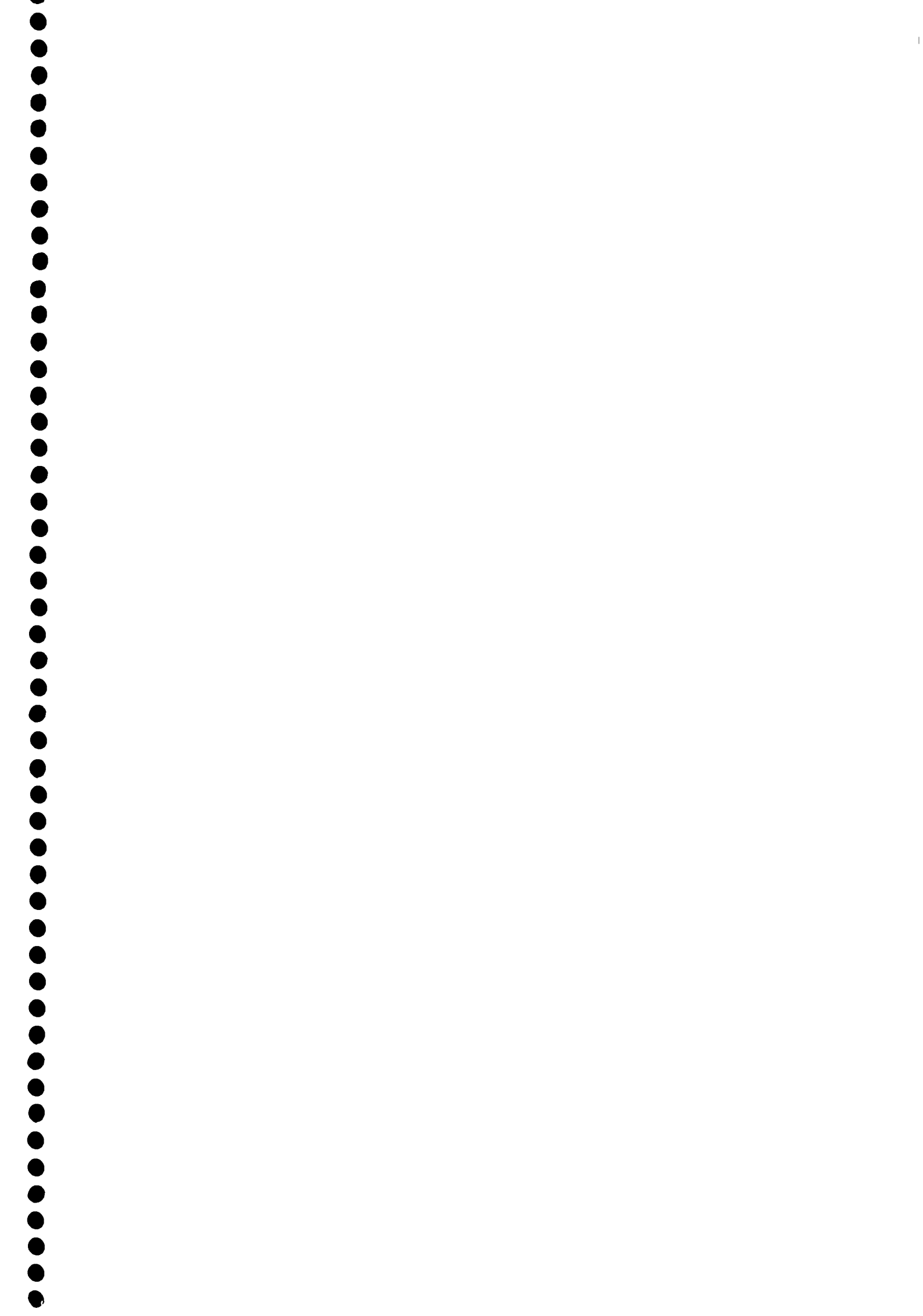
Figura 1. Obtención quimio-enzimática de nucleósidos naturales y modificados.

En primer lugar, se desarrolló una estrategia general de obtención de furanosas-5-fosfato utilizando un esquema de protección química y desprotección selectiva con lipasas, combinado con una fosforilación química. De esta forma se sintetizaron D-ribosa 5-fosfato, 2-desoxi-D-ribosa 5-fosfato y D-arabinosa 5-fosfato.

Luego se exploró la reacción de glicosidación enzimática de nucleósidos mediante el acoplamiento de nucleósido fosforilasa (NPs) con la fosfopentomutasa (PPM). Esta última, al no ser una enzima comercial, debió ser sobreexpresada y purificada, y su actividad debió ser optimizada para ser utilizada en las reacciones de síntesis de nucleósidos. De esta forma se han obtenido con altos rendimientos (70-100%) los nucleósidos: adenosina, inosina, 6-mercaptopurín ribonucleósido, 1,2,4-triazol-3-carboxamida ribonucleósido (Rivabirina), timidina, 2'-desoxiuridina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina y 5-bromo-2'-desoxiuridina. Asimismo se han obtenido diversos nucleósidos con moderados rendimientos (30-50%), tales como la guanosina, 2-amino-6-cloro-purín ribonucleósido, 2-fluoroadenosina e hipoxantín arabinonucleósido. Finalmente se han obtenido con escaso rendimiento (10-30%) los siguientes nucleósidos: adenín arabinonucleósido, 6-mercaptopurín arabinonucleósido, 1,2,4-triazol-3-carboxamida arabinonucleósido, 2'-desoxiinosina y 2-amino-6-cloro-purín 2'-desoxirribonucleósido.

Luego se llevó a cabo la inmovilización de la enzima sobreexpresada PPM, y la co-inmovilización del sistema enzimático acoplado (PPM-NP).

Por último, se realizó un estudio computacional para desarrollar una propuesta estructural de la PPM de *E. coli* y determinar aproximadamente el sitio activo de la misma y el modo de unión de los ligandos.



CHEMOENZYMATIC SYNTHESIS OF NATURAL AND MODIFIED NUCLEOSIDES

This thesis presents a versatile and economic strategy for the synthesis of natural and modified nucleosides, using natural sugars as starting materials. The used chemoenzymatic approach is summarized in Figure 1.

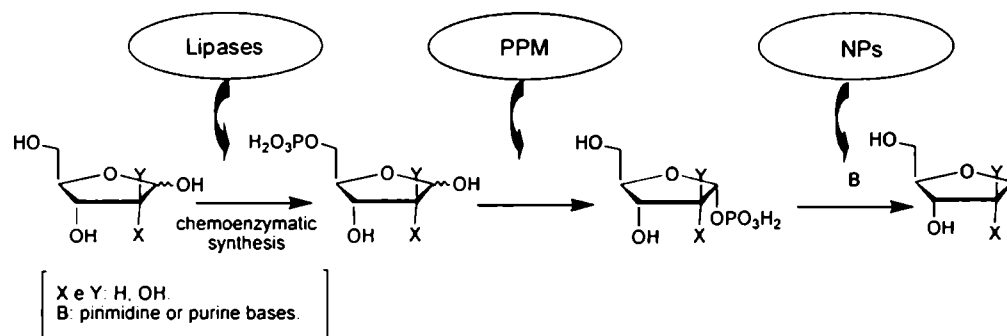


Figure 1. Schematic representation of the used strategy

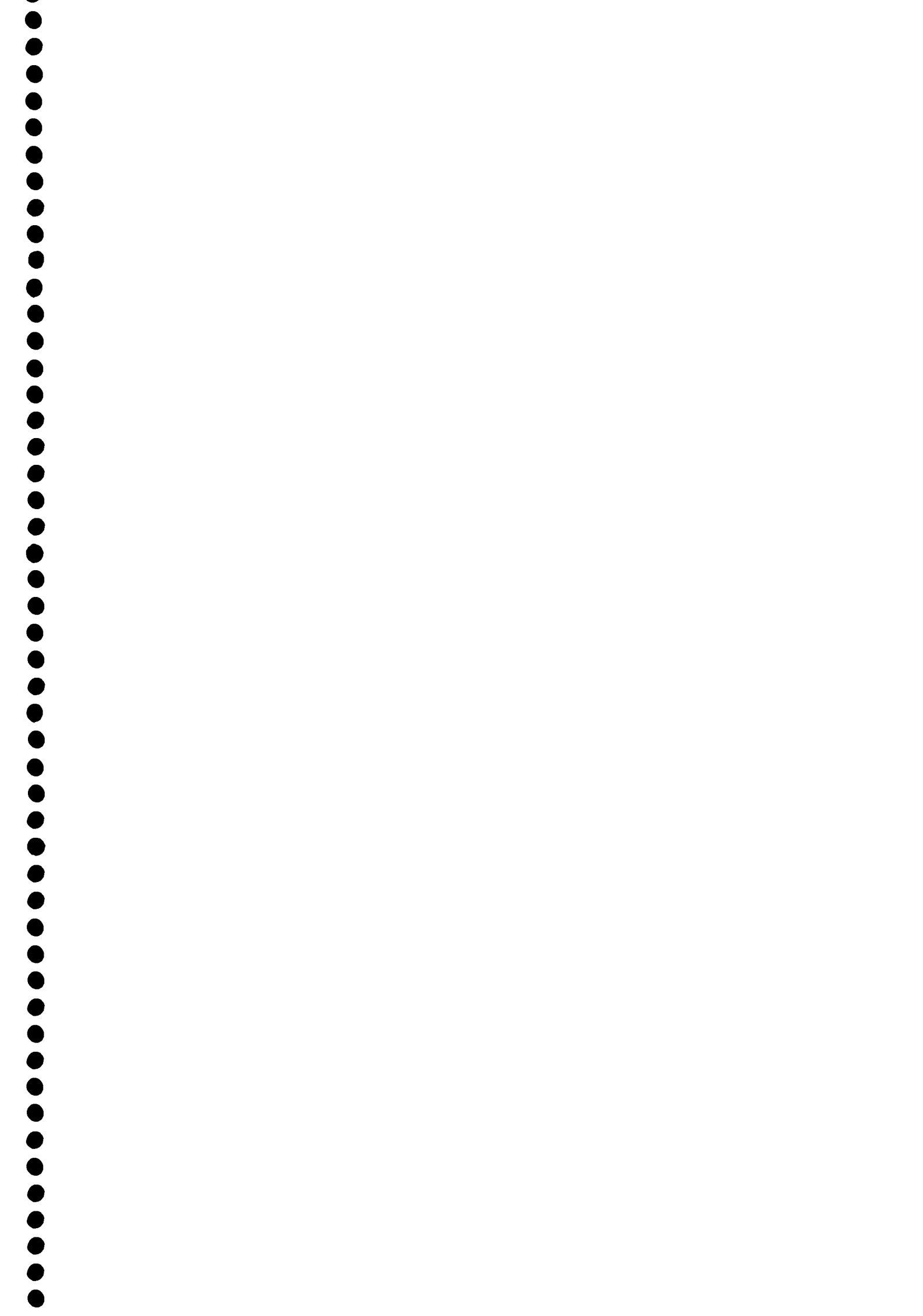
In first place, a general strategy for the preparation of furanoses 5-phosphate was developed by means of a selective protection-deprotection scheme using lipases, combined with chemical phosphorylation. Thus, D-ribose 5-phosphate, 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate and D-arabinose 5-phosphate were synthesized.

Then, the enzymatic synthesis of nucleosides was explored by coupling nucleoside phosphorylases (NPs) and phosphopentomutase (PPM). The latter, not being commercially available, had to be overexpressed and purified, and its activity optimized, in order to be used in nucleoside synthesis reactions.

In this way, the following nucleosides were obtained in high yields (70-100 %): adenosine, inosine, 6-mercaptopurine ribonucleoside, 1,2,4-triazol-3-carboxamide ribonucleoside, thymidine, 2'-deoxyuridine, 5-fluoro-2'-deoxyuridine and 5-bromo-2'-deoxyuridine. Also, several nucleosides were obtained with moderate yields (30-50%), such as: guanosine, 2-amino-6-chloropurine ribonucleoside, 2-fluoroadenosine and hypoxanthine arabinonucleoside. Finally, adenine arabinonucleoside, 6-mercaptopurine arabinonucleoside, 1-1,2,4-triazol-3-carboxamide arabinonucleoside, 2'-deoxyinosine and 2-amino-6-chloropurine 2'-deoxyribonucleoside, were obtained with low yields (10-30%).

Then, the immobilization of the overexpressed PPM, and the co-immobilization of the coupled enzyme system (PPM-NP) was achieved.

Finally, a computational study directed to explore PPM's structure, the approximate determination of its active site and binding mode of the ligands was accomplished.



Agradecimientos

Extraño momento es este en el que tengo que resumir todos estos años de tesis. Debo agradecer de forma expresa a todos los que han aportado algo a su realización (y son muchos) pero hay que reconocer que no podría citar a todos y cada uno de ellos. Por eso me anticipo en pedir disculpas a todos aquellos a los que no citare en el siguiente texto.

Primero debo agradecer a mi núcleo familiar en el que también incluyo a amigos que se han convertido en hermanos con el tiempo. Especialmente a mis padres sin los cuales hoy no podría ser quien soy. Siempre han apoyado cada una de mis decisiones. Su apoyo fue, es y será simplemente invaluable en mi vida. Papa: con tus libros, escritos, relatos y con nuestras eternas disquisiciones filosóficas has despertado en mi el espíritu científico y mi carácter explorador, de lo cual te estaré eternamente agradecida.

Por supuesto debo agradecerle a mi director, el Dr. Javier Montserrat, así como a mi co-director, el Dr. Adolfo Iribarren, por haber confiado en mi persona, siempre, por su paciencia y guía en este camino largo, hermoso y a veces tortuoso que es la realización de una tesis.

Un agradecimiento especial al Dr. Rodrigo Pontiggia y la próxima Dra. Laura Robaldo, mis compinches del laboratorio, por la colaboración, paciencia, apoyo brindados desde siempre y sobre todo por esa gran amistad que me brindaron, por escucharme y aconsejarme siempre.

Así también a todo el personal del INGEBI, tanto becarios como doctores, dirección, recepción y demás, ya que dentro de los ámbitos que a cada uno le competen me han ayudado sin restricciones. Especialmente al Dr. Diego Weigner, Dr. Leon Beauvier y el Dr. Claudio Pereira, sin cuyos aportes no habría salido airoso de mi incursión por la desconocida área de la biología molecular.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, por formarme y seguir haciéndolo. Por su gente, muchos de los cuales hoy puedo llamar amigos.

A todo el grupo de la Dra. Anna Tramontano de la Universidad de la Sapienza, Roma, que me recibieron con los brazos abiertos para asesorarme en el campo de la biología computacional.

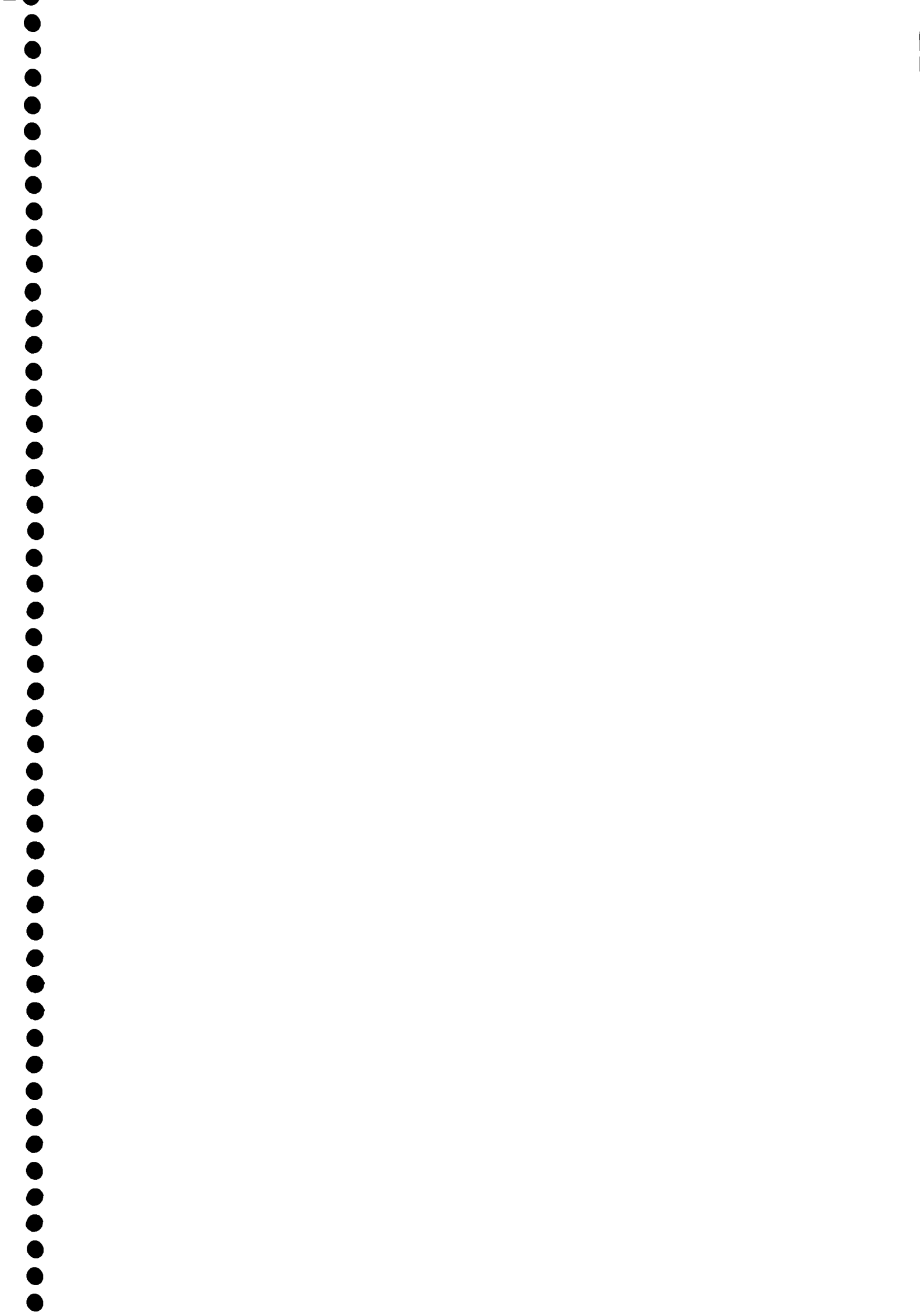
Al Dr. Jobbagy, por su ayuda en el campo de los materiales.

A mis eternos amigos de toda la vida, Vale, Sole y Mati, que más que amigos son hermanos, por su incondicional apoyo y animo en cada momento de mi vida. A Ceci, Sil, María, Mar, Diego, Juan, Eze, Maries, Aleli (y sus hermosos amigos los cuales poco a poco voy considerando míos), Ser, Sophie, Agus y muchísimos más amigos que son mi cable a tierra, por mi

alegría que se las debo, por ayudarme a crecer y madurar como persona, ayudándome en todas las circunstancias posibles. Especialmente a vos sil, que me has tolerado larguísimos fines de semana en tu hogar leyendo y releendo estas páginas.

Por último, al CONICET y al SECYT, sin cuya financiación no habría podido llevar a cabo este trabajo.

Gracias a todos,



Abreviaturas y símbolos

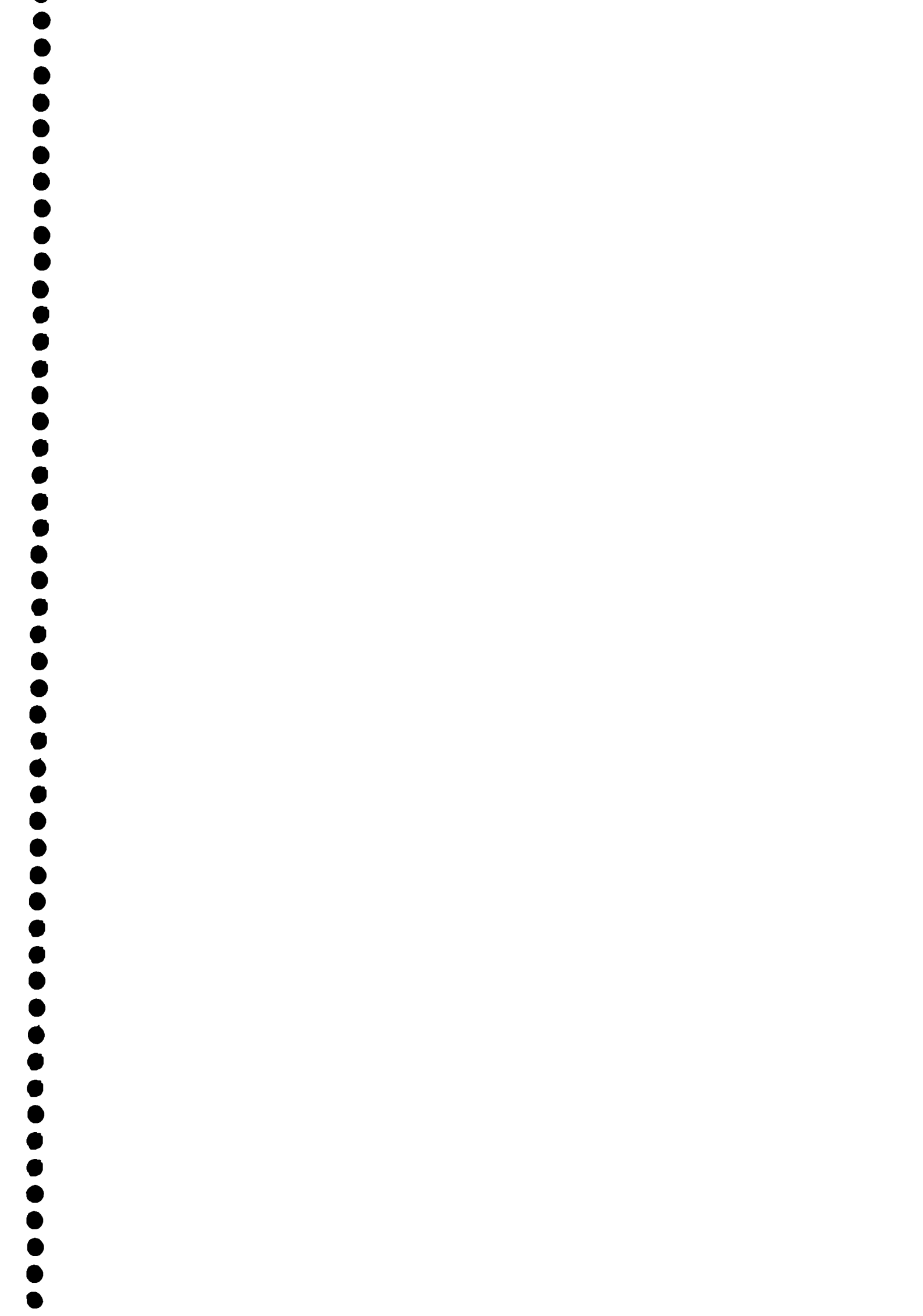
2AA	2'-amino-2'-desoxiadenosina
2AI	2'-amino-2'-desoxiinosina
2AU	2'-amino-2'-desoxiuridina
2-Br-U	5-bromouracilo
2-F-A	2-fluoroadenina
2-PGA	2-fosfoglicerato
3D	tridimensional
3-PGA	3-fosfoglicerato
5-F-U	5-fluorouracilo
6-Cl-2-NH ₂ -pu	6-cloro-2-amino purina
6-SH-Pu	6-mercapto purina
A	adenosina
A-5-P	arabinosa 5-fosfato
Ac ₂ O	anhídrido acético
ACN	acetonitrilo
AcO	acetilo
AcOEt	acetato de etilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosina 5'-difosfato
anh.	anhidro/a
aprox.	aproximadamente
ARA-A	adenín arabinósido
ARA-C	citidín arabinósido
ARA-TI	6-mercaptinosín-arabinósido
ARA-U	uridín arabinósido
ARN	ácido ribonucleico
ARNi	ácido ribonucleico de interferencia
aromat.	aromático
Asp	ácido aspártico
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BDDDP	2-terbutilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diazafosforina
Bn	bencilo
BSA	bis(trimetilsilil)acetamida
c.c.d	cromatografía en capa delgada
CAL-B	lipasa de <i>Candida antártica</i> B
CRL	lipasa de <i>candida rugosa</i>
Cys	cisteína
D	doblete
Dd	doble doblete
DDA	2',3'-didesoxiadenosina

Abreviaturas y símbolos

DDI	2',3'-didesoxiinosina
DDU	2',3'-didesoxiuridina
DERA	2-desoxirribosa 5-fosfato aldolasa
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido perdeuterado
dR-1-P	2-desoxirribosa 1-fosfato
dR-5-P	2-desoxirribosa 5-fosfato
DTT	1,4-ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida
EDTA	ácido etilendiamintetracético
equiv.	equivalentes
EtOH	etanol
F-1-P	furanosa 1-fosfato
F-5-P	furanosa 5-fosfato
Glu	ácido glutámico
h	hora/s
Hip	hipoxantina
His	histidina
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
Hs	hidrógenos
IPGM	2,3-bifosfogliceratomutasa independiente
iPr	isopropiliden
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Lys	lisina
m	multiplete
MEOD	metanol deuterado
MEOH	metanol
Mops	ácido morfolino propano sulfónico
Mr	peso molecular (masa relativa)
NP	nucleósido fosforilasa
NTA	ácido nitriloacético
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	buffer fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	proteín data bank
PEG	polietilenglicol
Ph	fenilo
Pi	fosfato inorgánico
PLE	lipasa de hígado de cerdo
PNP	purín nucleósido fosforilasa
PPM	fosfopentomutasa

Abreviaturas y símbolos

ppm	partes por millón
p-TsCl	cloruro de p-toluensulfonilo
PVA	alcohol polivinílico
Py.	piridina
PyNP	pirimidín nucleósido fosforilasa
q	cuarteto
R-1-P	ribosa 1-fosfato
R-5-P	ribosa 5-fosfato
Rf	relación de frente
RMN	resonancia magnética nuclear
RMSD	desviación cuadrática media
s	singulete
sa	singulete ancho
SDS	dodecilsulfato sódico
Ser	serina
t	triplete
TBHP	terbutilhidroperóxido
TCA	1,2,4-triazol-3-carboxamida
TEA	triethylamina
TEOS	tetraetil-orto-silicato
THEOS	tetra(2-hidroxietil)-orto-silicato
THF	tetrahidrofurano
Thr	treonina
TMOS	tetrametilortosilicato
TMS-Tf	triflato de trimetilsililo
TP	timidín fosforilasa
Tris	tris[tris(hidroximetil)aminometano]
U.V.	ultravioleta
UP	uridín fosforilasa
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1- Nucleósidos naturales y modificados. Generalidades y aplicaciones	1
1.1.1- Generalidades	1
1.1.2- Aplicaciones de los nucleósidos naturales y modificados	2
1.2- Síntesis química clásica de nucleósidos naturales y modificados	11
1.2.1- Formación del enlace glicosídico	12
1.2.1.1- <i>Control de la configuración anomérica en las reacciones de glicosidación</i>	16
1.2.1.2- <i>Estrategias para la síntesis estereo y regioselectiva de 2'-desoxirribonucleósidos</i>	17
1.2.2- Desventajas de la síntesis química clásica	18
1.3- Síntesis quimio-enzimática de nucleósidos modificados	19
1.3.1- Biotransformaciones	19
1.3.1.1- <i>Generalidades de las biotransformaciones</i>	19
1.3.1.2- <i>Enzimas utilizadas en procesos biocatalíticos</i>	19
1.3.1.3- <i>Las ventajas de las reacciones biocatalizadas contra la síntesis química clásica</i>	20
1.3.2- Estrategia propuesta para la síntesis quimio-enzimática de nucleósidos naturales y modificados.	22
1.3.3- Parte I: Síntesis quimio-enzimática de furanosas 5-fosfato.	25
1.3.3.1- <i>Enzimas utilizadas en la reacción de acetilación-desacetilación de azúcares: Lipasas</i>	26
1.3.3.2- <i>Antecedentes del uso de hidrolasas en las reacciones de protección-desprotección de azúcares</i>	29
1.3.4- Parte II: Síntesis enzimática de nucleósidos modificados	31
1.3.4.1- <i>Generalidades</i>	31
1.3.4.2- <i>Nucleósido fosforilasas (NPs)</i>	31
1.3.4.2.1- <i>Antecedentes del uso de NPs en la síntesis de nucleósidos.</i>	35
1.3.4.3- <i>Fosfopentomutasas (PPMs).</i>	38
1.3.4.3.1- <i>Antecedentes del uso de PPMs en la síntesis de nucleósidos</i>	39

1.4- Introducción de sobreexpresión de proteínas	41
1.4.1- Selección del tipo de construcción génica y célula huésped	42
1.5- Inmovilización de Enzimas	44
1.5.1- Generalidades	44
1.5.2- Métodos de inmovilización	46
1.5.3- Selección del método de inmovilización	47
1.5.4- Atrapamiento de enzimas por tecnología sol-gel	45
1.5.4.1- <i>Definición y características del proceso sol-gel</i>	48
1.5.4.2- <i>Atrapamiento de biomoléculas vía el proceso sol-gel de sílica</i>	50
1.5.4.3- <i>Sol-gel basados en un templado (direct-template-assembly)</i>	51
1.5.4.4- <i>Antecedentes del atrapamiento de enzimas utilizando sistemas sol-gel de sílica</i>	52
1.6- Modelización de proteínas	53
1.6.1- Métodos de modelización de proteínas	54
1.6.2- Modelado por homología	55
1.6.2.1- <i>Búsqueda de templados</i>	56
1.6.2.2- <i>Correcto alineamiento secuencia templado- secuencia target</i>	57
1.6.2.3- <i>Construcción y evaluación del modelo</i>	58
1.6.2.4- <i>Refinamiento del modelo obtenido</i>	60
1.6.3- Evaluación de la interacción proteína-ligando	62
1.6.3.1- <i>Experimentos de acoplamiento molecular utilizando AUTODOCK</i>	64
2. PARTE EXPERIMENTAL	
<hr/>	
2.1- Materiales	69
2.1.1- Reactivos	69
2.1.2- Cromatografía y material para purificación	71
2.1.3- Enzimas	71
2.1.4- Sistemas de vectores	72
2.1.5- Buffers y medio de cultivo	72
2.2- Consideraciones generales	73
2.3- Metodología	75

2.3.1-	Obtención de los productos triacetilados	75
2.3.1.1-	<i>Síntesis de metil 2,3,5-tri-O-acetil-D/L-pentofuranósidos</i>	75
2.3.1.2-	<i>Síntesis de butil 2,3,5-tri-O-acetil-D/L-pentofuranósidos</i>	78
2.3.1.3-	<i>Síntesis de 3,5-di-O-acetil-1,2-O-isopropiliden-α-D-xilofuranósido</i>	80
2.3.2-	Reacciones enzimáticas de desacetilación	82
2.3.2.1-	<i>Reacciones de desacetilación enzimática utilizando CRL</i>	82
2.3.2.2-	<i>Reacciones de desacetilación enzimática utilizando tejido vegetal</i>	86
2.3.3-	Síntesis del precursor del 3-amino-3-desoxi-D-ribofuranosa 5-fosfato y/o 3-azido3-desoxi-D-ribofuranosa 5-fosfato	90
2.3.4-	Síntesis de las furanosas 5-fosfato	94
2.3.4.1-	<i>Síntesis de D-ribosa 5-fosfato</i>	94
2.3.4.2-	<i>Síntesis de D-arabinosa 5-fosfato</i>	95
2.3.4.3-	<i>Síntesis de 2-desoxi-D-ribosa 5-fosfato</i>	98
2.3.4-	Sobreexpresión de la enzima PPM de <i>Escherichia coli</i>	101
2.3.4.1-	<i>Obtención de la secuencia de la PPM y diseño del cebador</i>	101
2.3.4.2-	<i>Amplificación del gen de la PPM mediante PCR</i>	102
2.3.4.3-	<i>Electroforesis en geles de agarosa</i>	102
2.3.4.4-	<i>Digestión de ADN con enzimas de restricción</i>	102
2.3.4.5-	<i>Construcción del plásmido PPM en el vector de expresión pGEM-T</i>	103
2.3.4.6-	<i>Ligación de fragmentos de ADN</i>	103
2.3.4.7-	<i>Construcción del plásmido PPM en el vector de expresión pRSET-A</i>	103
2.3.4.8-	<i>Extracción y purificación del plásmido. Secuenciación</i>	103
2.3.4.9-	<i>Transformación del vector de expresión en E coli. competentes</i>	104
2.3.4.10-	<i>Crecimiento de las células e inducción de la expresión de la PPM</i>	105
2.3.5-	Purificación y concentración de la enzima recombinante	105
2.3.5.1-	<i>Purificación de la proteína recombinante con resinas de Ni-NTA</i>	105
2.3.5.2-	<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	106
2.3.5.3-	<i>Dialisis y concentración de la enzima purificada</i>	106
2.3.6-	Ensayos de actividad	106
2.3.7-	Procedimiento general para la síntesis de diversos nucleósidos naturales y de nucleósidos modificados	107
2.3.7.1-	<i>Síntesis enzimática de nucleósidos</i>	107

2.3.7.2- Cromatografía líquida de alta presión	107
2.3.8- Inmovilización enzimática	109
2.3.8.1- Inmovilización en geles de sílice-PVA	109
2.3.8.2- Inmovilización en geles de sílice-quitosano	110
2.3.9- Elucidación estructural y funcional de la enzima PPM	112
2.3.9.1- Modelado por homología	112
2.3.9.2- Determinación del sitio de unión a sustrato	113
2.3.9.3- Determinación del modo de unión	114

3- SÍNTESIS DE FURANOSAS 5-FOSFATO

3.1- Objetivos y resumen	117
3.2- Esquema general de la síntesis de furanosas 5-fosfato	117
3.3- Resultados y discusión	118
3.3.1- Síntesis de alquil furanósidos acetilados	118
3.3.2- Síntesis químico-enzimática de furanosas diacetiladas - reacciones enzimáticas de desacetilación	123
3.3.2.1- Reacciones de hidrólisis enzimática de los metil 2,3,5-tri-O-acetil-D/L-pentofuranósidos utilizando CRL	124
3.3.2.2-Reacciones de hidrolisis enzimática de los metil 2,3,5-tri-O-acetil-D/L-pentofuranósidos utilizando tejido vegetal	128
3.3.2.3-Reacciones de hidrolisis enzimática de los butil 2,3,5-tri- O-acetil- D- pentofuranósidos utilizando tejido vegetal	133
3.3.2.4- Reacciones de hidrólisis enzimática de la 3,5-di-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa utilizando diversas fuentes enzimáticas	136
3.3.3- Síntesis del precursor del 3-amino- y 3-azido3-desoxi-D-ribofuranosa 5-fofato utilizando la 3,5-di-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa	139
3.3.3.1- Análisis restrosintético	139
3.3.3.2- Síntesis del 3-azido-3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-ribofuranosa 5-difenil fosfato	141
3.3.4- Síntesis de furanosas 5-fosfato	146
3.3.4.1- Síntesis de D-ribosa 5-fosfato	146

3.3.4.2- Síntesis de D- arabinosa 5-fosfato	153
3.3.4.3- Síntesis de 2-desoxi-D-ribosa 5-fosfato	155
3.4- Conclusiones	159
4. SOBREEXPRESION, PURIFICACION Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE LA PPM DE E. Coli	
<hr/>	
4.1- Objetivos y resumen	161
4.2- Resultados y discusión	161
4.2.1- Selección del sistema de expresión	161
4.2.2- Clonado del gen de la PPM de E. coli K-12 en el vector pRSET-A	163
4.2.3- Transformación del plásmido pRSET-A-PPM en E. coli BL21(DE3)pLysS	165
4.2.4- Expresión y purificación de la proteína recombinante PPM de E. coli	166
4.2.5- Optimización de la actividad de la PPM	172
4.3- Conclusiones	178
5- SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE NUCLEÓSIDOS NATURALES Y NUCLEÓSIDOS MODIFICADOS	
<hr/>	
5.1- Objetivos y resumen	181
5.2- Resultados y discusiones	181
5.2.1- Esquema general de la síntesis enzimática de nucleósidos	181
5.2.2- Síntesis enzimática de ribonucleósidos	182
5.2.3- Síntesis enzimática de desoxirribonucleósidos	185
5.2.4- Síntesis enzimática de arabinonucleósidos	189
5.3- Conclusiones	191
6- INMOVILIZACION DE LA PPM Y CO-INMOVILIZACIÓN DE LA PPM Y PNP	
<hr/>	
6.1- Objetivos y resumen	193
6.2- Resultados y discusión	193
6.2.1- Selección de la técnica de inmovilización	193

6.2.2-	Inmovilización en compuestos híbridos de quitosano-silica mediante la tecnología sol-gel	199
6.2.2.1-	<i>Obtención y caracterización del precursor THEOS</i>	200
6.2.2.2-	<i>Inmovilización de la PPM: Efecto de la concentración de THEOS y quitosano en la inmovilización por sol-gel</i>	201
6.2.2.3-	<i>Co-inmovilización de las enzimas PPM y PNP en sol-geles híbridos de quitosano y sílica</i>	205
6.3-	Conclusiones	207

7- ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA PPM DE *E. coli*

7.1-	Objetivos y resumen	209
7.2-	Resultados y discusión	210
7.2.1-	Elucidación estructural de la PPM: Modelado por homología	210
7.2.2-	Localización del sitio de unión al sustrato	216
7.2.3-	Determinación del modo de unión	220
7.2.3.1-	<i>Estudios preliminares en sistemas conocidos</i>	222
7.2.3.2-	<i>Experimentos de docking - selección de las condiciones experimentales</i>	224
7.2.3.3-	<i>Experimentos de docking evaluando como ligando las furanosas 5-fosfato</i>	227
7.2.3.4-	<i>Experimentos de docking evaluando las α-D-furanosas 1-fosfato.</i>	228
7.2.4-	Una explicación experimental	230
7.3-	Conclusiones	231

8- RESUMEN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

8.1-	Resumen de resultados	233
8.2-	Conclusiones y perspectivas	234

1 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Capítulo 1

Introducción y objetivos

1.1- Nucleósidos naturales y modificados- Generalidades y aplicaciones

1.1.1- Generalidades

Los nucleósidos son las subunidades del ADN o ARN y consisten en una base nitrogenada unida a una pentosa, por medio de un enlace glicosídico con configuración β entre el carbono anomérico del azúcar y un nitrógeno de la base (N1 en las pirimidinas y N9 en las purinas). Las bases naturales que forman parte de estos nucleósidos son la adenina, timina, guanina, citosina y el uracilo, mientras que las pentosas son la D-ribosa (ARN) y la D-desoxirribosa (ADN) (Figura 1.1).

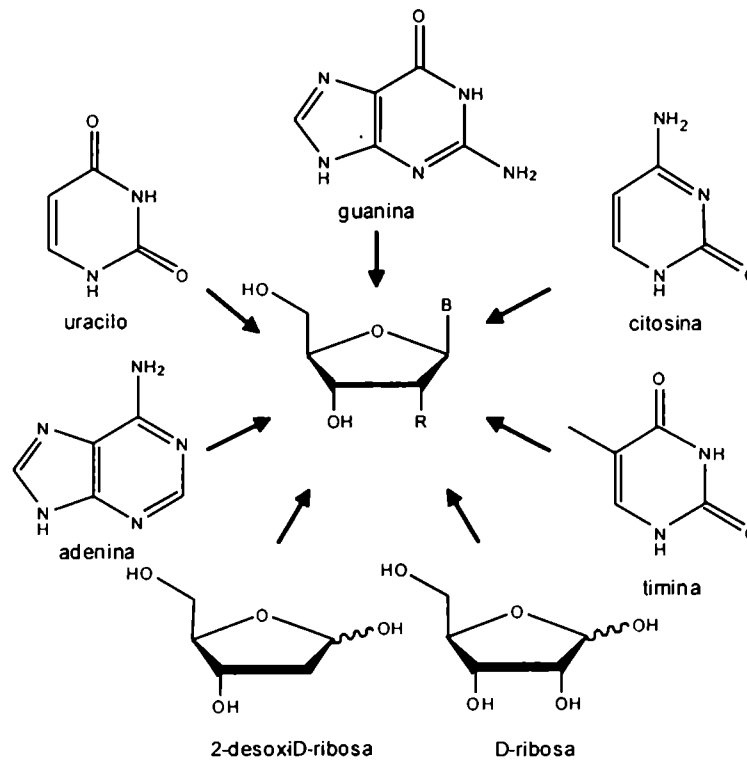


Figura 1.1. Nucleósidos naturales

2 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Los análogos de nucleósidos son compuestos en los cuales se ha modificado una de las partes integrantes de la molécula. Estas modificaciones pueden introducirse tanto en la base nitrogenada, como en el azúcar correspondiente o en ambos. Las modificaciones en la base, en general, son sustituciones en la misma, en cambio, se pueden hallar una enorme diversidad de modificaciones en el azúcar, como ser por ejemplo, aperturas de ciclo (nucleósidos acíclicos), homólogos superiores e inferiores, sustituciones isostéricas, eliminación o sustitución de hidroxilo en la posición C2' y C3', transposiciones de la base a C2' o a C3', entre muchas otras.

Esta similitud estructural con los nucleósidos naturales, es la que los hace capaces de alterar el funcionamiento de los ácidos nucleicos o de bloquear determinados procesos esenciales para su replicación. El amplio rango de actividades biológicas de estos análogos de nucleósidos los hace los principales blancos y los candidatos más prometedores para desarrollar terapias antivirales y antineoplásicas^{1,2}.

1.1.2- Aplicaciones de los nucleósidos naturales y modificados

- Antivirales

Las drogas antivirales son una clase de medicamento utilizado para el tratamiento de infecciones virales. El desarrollo de este tipo de compuestos ha sido históricamente lento. La razón de esto radica, paradójicamente, en la simplicidad de los virus. Los virus son agentes infecciosos sub-microscópicos constituidos por material genético (ADN o ARN) que se encuentra recubierto por una cápside proteica. Esta estructura puede estar, a su vez, rodeada por la envoltura vírica, una capa lipídica con diferentes proteínas conjugadas, dependiendo del virus. Estas entidades biológicas son parásitos intracelulares estrictos y sólo pueden replicarse apropiándose de la maquinaria metabólica de la célula infectada, para así producir nuevas partículas virales. Debido a que su ciclo replicativo está altamente ligado a la célula que infecta, es difícil afectar la replicación viral sin alterar las funciones celulares. Así mismo, no se disponen de modelos animales adecuados, complicando de esta manera su evaluación.

Los primeros antivirales se desarrollaron en los años sesenta por métodos de ensayo y error, pero poco se conocía de su mecanismo de acción y de los blancos virales. Con el advenimiento de

¹ Alastair, A.; *Word Drug Therapy*, 1999, 340, 1255

² Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J.; *Nucleosides Nucleotides*, 1992, 11, 903

3 Capítulo 1. Introducción y objetivos

la biología molecular, la elucidación en los años ochenta de las secuencias genéticas de los virus y con los avances en el conocimiento de sus ciclos replicativos, ha sido posible el desarrollo de antivirales específicos y racionalmente diseñados.

- Etapas afectadas por las drogas antivirales en el ciclo replicativo del virus

Para comprender como actúan los antivirales y cuáles son los blancos posibles de acción, se debe conocer la estructura y el ciclo replicativo del virus en estudio. Estos ciclos difieren en detalles específicos dependiendo de la especie de virus, pero todos comparten un patrón general. Un agente antiviral ideal afecta la replicación en un sitio específico y esencial del ciclo replicativo sin afectar el metabolismo celular normal. A continuación se resume en la **Figura 1.2** las etapas generales del ciclo viral.

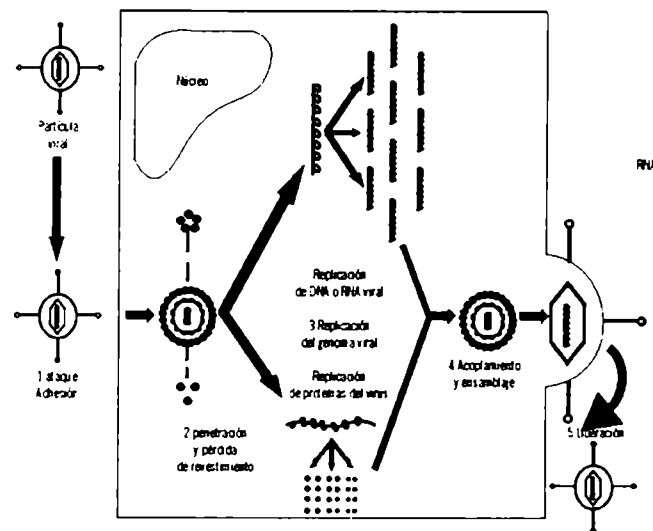


Figura 1.2. Ciclo replicativo del virus

- Adsorción
- Penetración
- Desnudamiento o liberación del genoma viral
- Replicación viral
- Síntesis y procesamiento de proteínas virales
- Ensamblaje

4 Capítulo 1. Introducción y objetivos

- Liberación

Los análogos de nucleósidos actúan principalmente en la etapa de replicación viral. Ésta es la fase sintética del ciclo replicativo del virus. Existen diferencias en esta etapa de acuerdo al material genético que constituye el núcleo del virus. En el caso de virus de ADN, se transcriben los ARNm específicos del ADN viral. Luego se utiliza la maquinaria celular para traducir el ARNm y sintetizar así todas las macromoléculas necesarias para generar una nueva progenie viral. En el caso de virus de ARN, el mismo material genético actúa como molde para la síntesis de su hebra complementaria. Por último, los retrovirus sintetizan la doble cadena de ADN a partir del ARN viral.

Los antivirales interfieren en la etapa de replicación del genoma viral:

- ✓ Virus ARN: los blancos apropiados en este caso son el ARN viral, la ARN polimerasa y/o el complejo replicativo. Los compuestos que actúan a este nivel son: ribavirina (análogo de nucleósido) y moléculas de ARN complementario (antisentido).
- ✓ Virus ADN: Los blancos más vulnerables son la fuente de desoxirribonucleótidos y las enzimas virales, sobre los que actúan los análogos de nucleósidos. Estos compuestos pueden actuar: Como terminadores de cadena, incorporándose al genoma viral, inhibiendo la elongación de la cadena de ADN; como inhibidores irreversibles de la polimerasa viral; o actuar a ambos niveles. En este grupo se encuentran los antivirales más efectivos en la clínica. También existen compuestos inhibidores de las polimerasas virales no análogos de nucleósidos.

Los análogos de nucleósidos son los fármacos más utilizados en terapia antiviral. De los antivirales aprobados por la FDA (Federal and Drug Administration), más del 50 % pertenecen a esta clase de compuestos (Tabla 1.1).

Nombre comercial	Tipo	Año de aprobación
Abacavir (ABC)	análogo de nucleósido	1998
Aciclovir (ACV)	análogo de nucleósido	1982
Adefovir	análogo de nucleósido	2002
Amantadine	no análogo de nucleósido	1966
Atazanavir	no análogo de nucleósido	2003
Brivudine	análogo de nucleósido	1980
Cidifovir	análogo de nucleósido	1996
Darunavir	no análogo de nucleósido	2006

5 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Delavirdine	no análogo de nucleósido	1997
Didanosine (ddI)	análogo de nucleósido	1991
Efavirenz	no análogo de nucleósido	2006
Emtricitabine (FTC)	análogo de nucleósido	2003
Enfuvirtide	no análogo de nucleósido	2003
Entecavir	análogo de nucleósido	2005
Famciclovir	análogo de nucleósido	2007
Fomivirsen	oligonucleótido	1998
Fosamprenavir	no análogo de nucleósido	2003
Ganciclovir (GCV)	análogo de nucleósido	1989
Idoxuridine	análogo de nucleósido	1963
Imiquimod	no análogo de nucleósido	1997
Indinavir	no análogo de nucleósido	1996
Interferon 1	no análogo de nucleósido	1986
Interferon 2	no análogo de nucleósido	1999
Lamivudine (3TC)	análogo de nucleósido	1995
Lopinavir	no análogo de nucleósido	2000
Raltegravir	no análogo de nucleósido	2007
Marviroc	no análogo de nucleósido	2007
Nelfinavir	no análogo de nucleósido	1997
Nevirapine	no análogo de nucleósido	1996
Penciclovir	análogo de nucleósido	1996
Ribavirin	análogo de nucleósido	1980
Rimadantine	no análogo de nucleósido	1994
Ritonavir	no análogo de nucleósido	1996
Saquinavir	no análogo de nucleósido	1995
Stavudine (D4T)	análogo de nucleósido	1994
Telbivudine	análogo de nucleósido	2006
Tenofovir (TDF)	análogo de nucleósido	2001
Tipranavir	no análogo de nucleósido	2005
Trifluridine	análogo de nucleósido	1980
Valaciclovir	análogo de nucleósido	1995
Valganciclovir	análogo de nucleósido	2001
Vidarabine (ARA-A)	análogo de nucleósido	1976
Viramidine	análogo de nucleósido	fase III
Zalcitabine (ddC)	análogo de nucleósido	1992
Zanamivir	no análogo de nucleósido	1999
Zidovudine (AZT)	análogo de nucleósido	1987

Tabla 1.1. Listado de antivirales aprobados por la FDA hasta el año 2007.

Sólo a manera de ejemplo, en la actualidad aciclovir y ganciclovir son los compuestos usados clínicamente para el tratamiento del virus del herpes. Zidovudine, didanosine, zalcitabine, lamivudine, stavudine y abacavir (Figura 1.3), en combinaciones con algunos antivirales no

6 Capítulo 1. Introducción y objetivos

análogos de nucleósidos, son los más utilizados en los tratamientos anti HIV, y lamivudine, adefovir, entecavir y telbivudine son los antivirales aprobados para el tratamiento de la Hepatitis B.

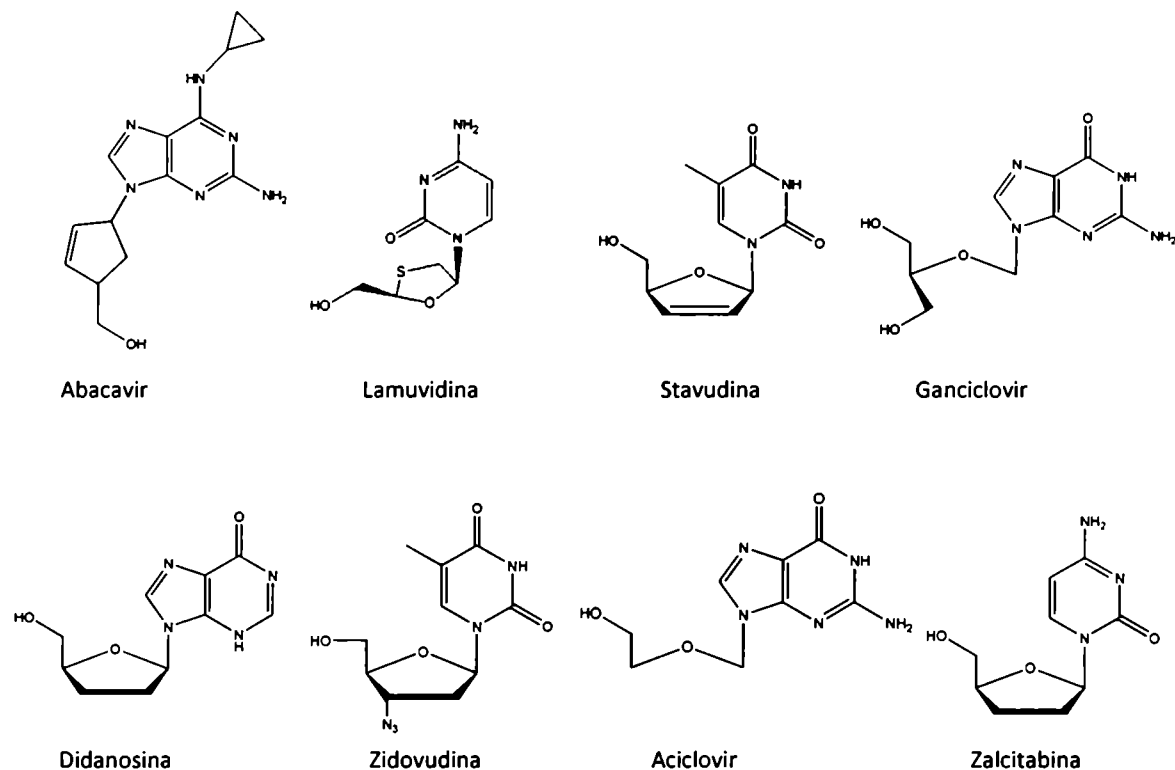


Figura 1.3. Nucleósidos modificados comerciales

Pese al crecimiento del desarrollo de los antivirales a lo largo de los años, esta área es muy activa, continuándose con el desarrollo de nuevos agentes quimoterapéuticos. El descubrimiento de la adquisición de resistencia y los efectos colaterales inespecíficos, por ejemplo, su citotoxicidad³, ha sido uno de los motivos fundamentales para la búsqueda de agentes antivirales más efectivos, más selectivos y no tóxicos.

- Antineoplásico

Los agentes antineoplásicos son drogas que inhiben o combaten el desarrollo de tumores. Existen varias clases de estos agentes: Agentes alquilantes, antimetabolitos, intercalantes, inhibidores de la topoisomerasa II, generadores de radicales libres, entre otros.

7 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Los análogos de nucleósidos pertenecen a la clase de los antimetabolitos. Por su similitud estructural con los metabolitos o nucleósidos naturales pueden interferir en la producción de ADN, lo que conlleva a un arresto en la división celular y en el crecimiento de tumores. Debido a que la velocidad de replicación es mayor en células tumorales, la inhibición de la división celular daña en mayor medida estas células.

Sus mecanismos de acción incluyen:

- Activación de la apoptosis por activación de caspasas, activación de receptores de muerte celular, y activación mitocondrial. Asimismo, la incorporación de análogos de nucleósidos en el ADN celular causa la ruptura de la hebra de ADN en fase S (sintética), desencadenando la apoptosis.
- Inhibición de las enzimas involucradas en la generación de nucleótidos purínicos y pirimidínicos.

Como ejemplo del uso de análogos de nucleósidos en terapia antineoplásica, se pueden citar los siguientes:

Análogos purínicos

-Fludarabina: Es un análogo arabinósido fosforilado de la adenosina, sustituido en la posición 2 de la base por un fluor (**Figura 1.4**). Inhibe la síntesis de ADN interfiriendo con enzimas como la ribonucleótido reductasa y la ADN polimerasa, entre otras.

-Cladribina: Es un análogo de la desoxiadenosina, en el cual la base se encuentra sustituida en la posición 2 por un cloro (**Figura 1.4**). Posee efectos inmunosupresores. Inhibe la adenosindeaminasa, lo cual interfiere con la habilidad de la célula de procesar ADN.

Análogos pirimidínicos

-Floxuridina: Es un análogo pirimidínico, en el cual la base se encuentra sustituida en la posición 5 por un fluor (**Figura 1.4**). La forma activa es la base fluorada que es liberada enzimáticamente en el cuerpo. Este compuesto actúa de diversas maneras, pero principalmente actúa como inhibidor de

³ Balint, G., *Pharmacology & therapeutics*, 2001, 89, 17-27

8 Capítulo 1. Introducción y objetivos

la timidilato sintetasa. Esta inhibición bloquea la síntesis de timidina, compuesto requerido para la replicación del ADN.

-Citarabina (ARA-C): Es un análogo modificado en el azúcar, en el cual la ribosa ha sido reemplazada por arabinosa (Figura 1.4). Este compuesto daña el ADN en su fase sintética. A su vez, inhibe tanto la ADN como la ARN polimerasas y la enzima nucleótido reductasa, necesarias para la síntesis de ADN.

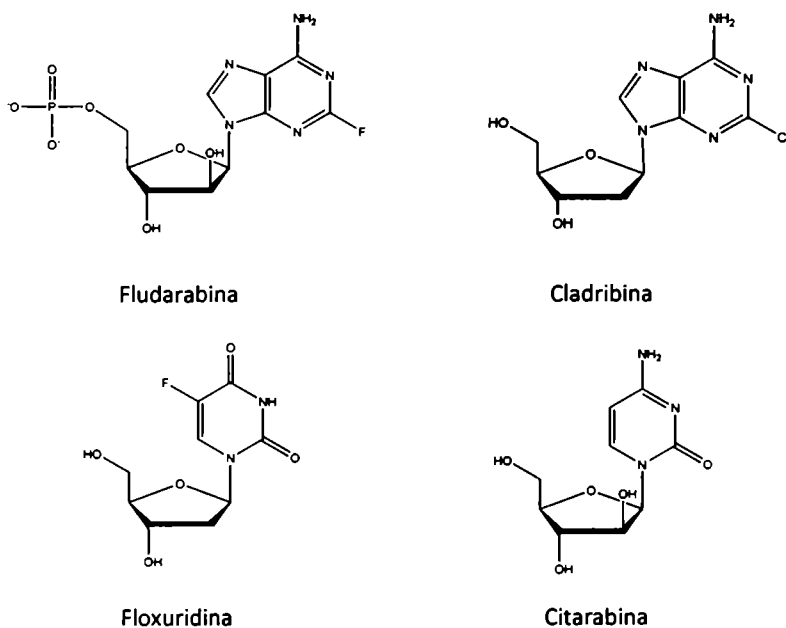


Figura 1.4. Análogos de nucleósidos utilizados en terapia antineoplásica

- Oligonucleótidos modificados

Los oligonucleótidos son oligómeros constituidos por monómeros nucleosídicos unidos entre sí por puentes fosfodiéster, constituyendo así, pequeños fragmentos de ADN o ARN.

Los oligonucleótidos modificados, son análogos de los correspondientes naturales, en los cuales los nucleótidos constituyentes se encuentran modificados en el azúcar, en la base, o en el grupo fosfato.

Estas modificaciones otorgan ventajas con respecto a sus contrapartes naturales, entre las cuales se encuentra incrementada la estabilidad en fluidos biológicos, al no ser estos sustratos de las enzimas celulares denominadas nucleasas que degradan los ácidos nucleicos naturales. Entre

9 Capítulo 1. Introducción y objetivos

sus variados usos en la clínica así como en la investigación, se pueden encontrar ejemplos del empleo de oligonucleótidos modificados en terapia antisentido, formando parte de ribozimas y/o desoxirribozimas y en ARN de interferencia y aptámeros^{4,5,6}.

El uso de oligonucleótidos en el campo de la terapéutica ofrece varias ventajas con respecto a las drogas tradicionales. En primer lugar precisa de menor concentración para producir el mismo efecto terapéutico, debido a que se logra atacar una enfermedad a nivel genético, mientras que las drogas tradicionales están dirigidas a proteínas que se encuentran en gran número de copias. En segundo lugar esta estrategia ofrece un enfoque general, ya que se parte del mismo tipo de compuestos químicos (nucleótidos) para la producción de fármacos contra diversas enfermedades. Finalmente, son moléculas de gran especificidad, ya que las secuencias son en general unívocas para cada blanco específico.

✓ Terapia antisentido.

Esta terapia consiste en la inhibición de la expresión de un gen específico a nivel del ARN. En este caso, el oligonucleótido se une por complementariedad al ARNm blanco, bloqueando de esta forma la expresión de proteínas codificadas por este ácido nucleico. Así mismo puede también activar la enzima RNasa H intracelular, cuya actividad consiste en degradar moléculas de ARN (que se encuentran hibridados al correspondiente ADN complementario). En 1978 Zamenick y Stephenson⁷ ilustraron por primera vez esta estrategia, en la cual demostraron la inhibición del virus sarcoma de Rous en un sistema celular.

Un ejemplo de este tipo de compuestos aplicados a terapia antisentido aprobado por la FDA, es el caso de la droga comercial Fomivirsen (comercializada bajo el nombre de vitravene) utilizada para el tratamiento de retinitis inducida por citomegalovirus en pacientes con SIDA.

Actualmente un sinnúmero de drogas antisentido están siendo investigadas en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, diabetes, esclerosis, distrofia muscular y enfermedades con componentes inflamatorios, como el asma y la artritis.

⁴ Kagiyama, A., *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **2001**, 2, 258

⁵ Iribarren A.; Sproat, B.; Neuner, P.; Sulston, I.; Ryder, U.; Lamond, A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 7747

⁶ Rosenbohm, W.; *Bioorganic Medicinal Chem.*, **2004**, 12, 2385

⁷ Zamenick, P.; Stephenson, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1978**, 75, 280

10 Capítulo 1. Introducción y objetivos

✓ Ribozimas y desoxirribozimas

Las ribozimas y desoxirribozimas son moléculas de ARN o ADN respectivamente, con actividad catalítica⁸. La principal actividad de estas moléculas es la de hidrolizar enlaces fosfato internucleotídicos de sustratos de ARN. Nuevamente, en este caso, las ventajas de introducir modificaciones en algunos de sus monómeros son análogas a las observadas en el uso de oligonucleótidos modificados y tiene como objeto aumentar su estabilidad biológica.

Algunas ribozimas pueden desempeñar un rol importante como agentes terapéuticos⁹, como biosensores¹⁰, y para aplicaciones en genómica funcional y descubrimientos de genes. Existen actualmente ribozimas en estudio clínico, para su uso contra el virus HIV¹¹, para diversos tipos de tumores (ANGIOZYME¹²), para el virus de la hepatitis C (HEPTAZYME¹³), entre otras.

✓ Aptámeros

Los aptámeros son moléculas oligonucleotídicas cortas que presentan una alta afinidad por proteínas, péptidos o moléculas orgánicas pequeñas¹⁴, en una forma conceptualmente similar a los anticuerpos monoclonales. Su mecanismo de acción se basa en el bloqueo mediante interferencia física, debido a unión específica ligando-aptámero. La ventaja con respecto al uso de anticuerpos es que estas moléculas pueden ser obtenidas utilizando métodos de evolución molecular *in-vitro*, sin tener que pasar por un sistema animal.

Al igual que las ribozimas o los oligonucleótidos antisentido, son susceptibles a la degradación por nucleasas en el medio intra y extra-celular. Por lo que su modificación puede proveerlos de una resistencia notable a la degradación. Existe ya un fármaco de aptámeros en el mercado para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (MACUGEN¹⁵).

⁸ Looney, D.; Yu, M.; Ribozyme protocols, Humana Press 1999, 74, 469

⁹ Christoffersen, R.; Marr, J.; *J. Med. Chem.*, 1995, 38, 2023

¹⁰ Breake, R.; *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13, 31

¹¹ Ridgen, J.; Ely, J.; Macpherson, J.; Gerlach, W; Sun, L.; Symonds, G.; *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2000, 2, 61

¹² U.S. Patent 6,346,398

¹³ Foster, G.; *Semin. Liver Dis.*, 2004, 24, 97

¹⁴ ver por ejemplo: a) Ellington A.; Szostak, J.; *Nature*, 1990, 346, 818, b) Tuerk, C.; Gold, L.; *Science*, 1990, 249, 505

¹⁵ Ng, E.; Shima, D.; Calias, P.,M; Cunningham, E.; Guyer, D.; Adamis, A.; *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006; 5, 123

Capítulo 1. Introducción y objetivos

✓ ARN de interferencia

El ARN de interferencia (ARNi) es una molécula doble cadena de ARN corta que suprime la expresión de genes homólogos específicos mediante mecanismos de interferencia por ARN. El ARNi es uno de los métodos más específicos en la ablación de genes, ya que diferencia la secuencia blanco específica de otras posibles secuencias blanco correspondientes a otros ARNm. Así mismo, es más eficiente que otras terapias ya que al ser moléculas cortas de ARN (alrededor de unos 20 nucleótidos) pasan inadvertidas por la respuesta inflamatoria. La terapia de ARNi puede aplicarse a enfermedades genéticas, autoinmunes, tumorales y virales. En este último caso ya ha habido avances debido a que se encontró un ARNi que bloquea la expresión de un oncogen conllevando al incremento de la supervivencia en pacientes con leucemia¹⁶.

1.2- Síntesis química clásica de nucleósidos naturales y modificados.

Los nucleósidos naturales y modificados pueden obtenerse por métodos de síntesis química clásica y/o por medio de reacciones biocatalizadas.

La síntesis química de nucleósidos se puede dividir en tres grandes aproximaciones. Una es la glicosidación directa de bases purínicas y pirimidínicas naturales y/o modificadas y sus derivados (1); la segunda es la construcción de anillos purínicos y pirimidínicos, a partir de precursores *N*-glicosilados (2), la tercera es la modificación química de un nucleósido natural. Éstas se ilustran por su análisis retrosintético en la **Figura 1.5**.

(1)- La desconexión A- identifica la formación del enlace glicosídico mediante la unión del azúcar a la base preformada. En la práctica, esta etapa hace uso de desplazamientos de buenos grupos salientes en la posición 1 de un monosacárido por medio de un nitrógeno nucleofílico de la base heterocíclica.

(2)- La doble desconexión B- identifica el proceso de construcción de la base heterocíclica sobre un enlace glicosídico preformado en el carbohidrato. Otra aproximación de este tipo se muestra como una doble desconexión C, que indica la formación de una base purínica sobre un nucleósido imidazólico preformado.

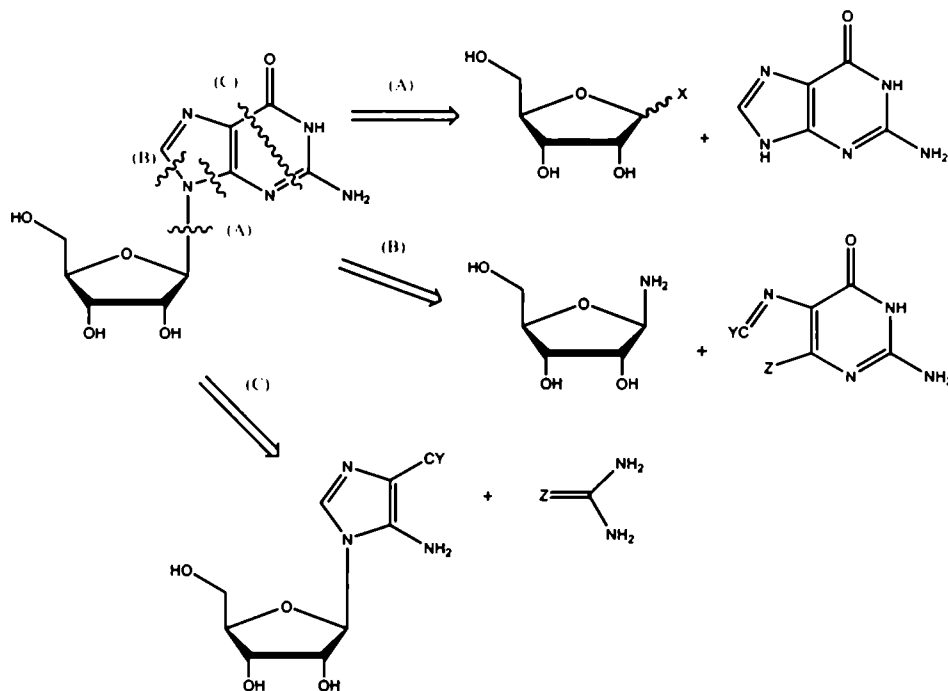


Figura 1.5. Análisis retrosintético de la síntesis tradicional de nucleósidos.

Con la idea de circunscribir los antecedentes al objeto de esta tesis, se concentrará la discusión en la próxima sección sobre la formación del enlace glicosídico.

1.2.1- Formación del enlace glicosídico

En la síntesis de nucleósidos por glicosidación directa, se pueden producir varios regioisómeros y estereoisómeros, por lo que el mayor desafío en estas reacciones implica el control regio (glicosidación en el N-1 en la caso de las pirimidinas y en el N-9 para las purinas) y estereoquímico (formación de nucleósidos con la configuración β).

Los métodos que se describirán a continuación, en general, se refieren a la síntesis de ribonucleósidos. Aunque estos se pueden extender a la síntesis de 2'-desoxirribonucleósidos, generalmente brindan selectividades pobres durante la formación del enlace glicosídico. Existen modificaciones de estas metodologías específicas para la síntesis de estos últimos, las cuales serán brevemente descriptas a continuación.

¹⁶ Frechtel, G.; *Bioquímica*, 2005, 30, 99-100

13 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Entre los diversos métodos químicos para la directa glicosidación se pueden citar:

- Bases de sales de metales pesados:

Fischer y Helferich¹⁷ y Koenigs y Knorr¹⁸ introdujeron por primera vez el uso de sales de metales pesados de purinas (inicialmente Ag(I)) para catalizar el desplazamiento nucleofílico de un halógeno en el C-1 de un azúcar protegido. En una posterior modificación, Davol y Lowry¹⁹ utilizaron sales de Hg(II) para mejorar los rendimientos de reacción. Esta síntesis permite obtener en general el nucleósido con la regioselectividad deseada y en muchos casos con la estereoselectividad indicada (el motivo se discutirá más adelante en este capítulo), tanto en purinas como en pirimidinas. Esta síntesis presenta la desventaja de partir tanto de bases como de azúcares protegidos, y en algunos casos de producir mezclas complejas de productos con distinta regio y estereoselectividad. Otras desventajas que pueden citarse son la pobre solubilidad de los derivados de mercurio y la inestabilidad de los derivados halogenados de los azúcares. Asimismo no es un método adecuado para la síntesis de nucleósidos con actividad biológica, debido a la potencial presencia de trazas de mercurio en el producto final.

En un ejemplo típico²⁰, la base cloromercurio-6-benzamidopurina reacciona con el cloruro o bromuro de 2,3,5-tri-*O*-acetil-D-ribofuranosa para dar el nucleósido protegido, a partir del cual, por medio de la remoción de los grupos protectores, se obtiene el nucleósido deseado (en este caso, adenosina). (Figura 1.6)

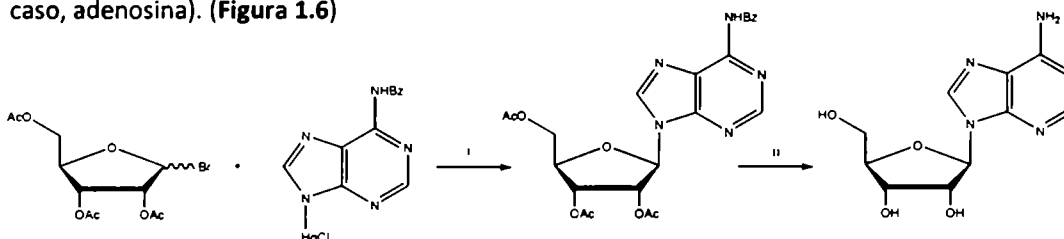


Figura 1.6. Uso de sales de metales pesados de las bases heterocíclicas para la síntesis de nucleósidos, (i) xileno, 120 °C; (ii) NH₃, MeOH

¹⁷ Fischer, E.; Helferich, B. *Chem. Ber.*, **1914**, *47*, 210

¹⁸ Koenigs, W.; Knorr, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1901**, *34*, 957

¹⁹ Davoll, J.; Lowry, B. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 1650

14 Capítulo 1. Introducción y objetivos

- Reacciones de fusión para la síntesis de nucleósidos:

Debido a la inestabilidad de los derivados halogenados de los azúcares se modificó la reacción de síntesis, generando el halógeno reactivo *in situ* por medio de la reacción de 1-acetoxiazúcares con ácidos de Lewis tales como TiCl_4 y SnCl_4 . Esta modificación llevó a los procesos de fusión, método introducido inicialmente por Sato et al²¹. Por calentamiento de un azúcar acetilado y una base tanto purínica como pirimidínica en presencia del catalizador ácido a presión reducida, se obtuvieron los productos de condensación (luego de su fusión). Esta reacción generalmente genera mezclas anoméricas, que habitualmente pueden separarse por cromatografía en columna de sílica gel.

Este método funciona mejor para purinas que contienen grupos atractores de electrones, de bajo punto de fusión.

- El método de Hilbert Johnson (de cuaternización):

Hilbert y Johnson notaron que las pirimidinas sustituidas eran suficientemente nucleofílicas para la reacción directa con los azúcares halogenados sin la necesidad del agregado de catalizadores electrofílicos. Es así que este método involucra la alquilación de una 2-alcoxipirimidina con un azúcar halogenado²². El producto inicial es una sal cuaternaria que a temperaturas elevadas elimina un haluro de alquilo para dar el producto de condensación (Figura 1.7).

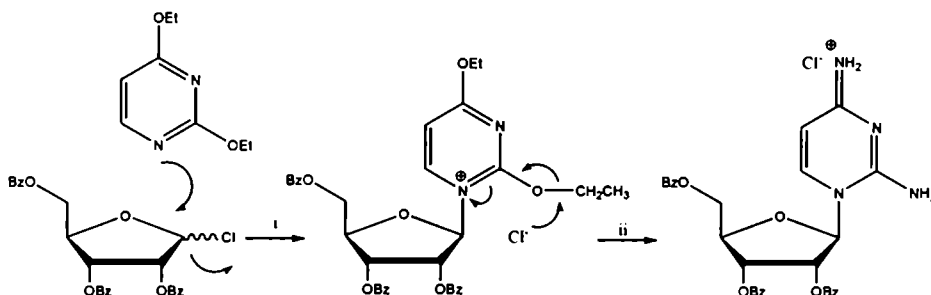


Figura 1.7. Método de cuaternización para la síntesis de nucleósidos, (i) CH_3CN , 10°C ; (ii) NH_3 , MeOH

²⁰ Ulbricht, T.; *Ang. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *1*, 476

²¹ Sato, T.; Shimadate, T.; Ishido, Y. *Nippon Kagaku Zasshi.*, **1960**, *81*, 1440

²² Hilbert, G.; Johnson, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1930**, *52*, 4489

15 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Estas condensaciones frecuentemente ofrecen mezclas anoméricas aunque el uso de HgCl_2 aumenta la proporción del anómero β .

- Glicosidación de Vorbruggen :

El método de Hilbert-Johnson ha evolucionado, siendo una de estas mejoras el uso de bases persililadas. Este método es particularmente útil cuando está presente un grupo α -aciloxi en la posición 2 del donador glicosídico, produciendo β -nucleósidos de forma estereocontrolada, debido al efecto anquimérico del mismo.

Las bases sililadas ofrecen tres ventajas: (1) son de fácil preparación, (2) reaccionan fácilmente con azúcares en solución homogénea, debido a su incrementada solubilidad y nucleofilicidad y (3) dan productos intermedarios que pueden ser fácilmente convertidos en las bases modificadas correspondientes. Como catalizadores ácidos, los primeros utilizados fueron los óxidos mercúricos y ácidos de Lewis, que han sido sustituidos por el uso de silil-éteres, entre los cuales se pueden citar: triflato de trimetilsililo, nonaflato de trimetilsililo y/o perclorato de trimetilsililo. La **figura 1.8** muestra un ejemplo de este tipo de procedimientos. La base sililada se sintetiza, en general, inmediatamente antes de la reacción de glicosidación, por calentamiento bajo reflujo con una mezcla de hexametildisiloxano y cloruro de trimetilsililo. Alternativamente se puede utilizar bis(trimetilsilil)acetamida (BSA). La base sililada reacciona subsiguientemente con el azúcar peracetilado, que es *in situ* convertido al halogenuro o al triflato correspondiente utilizando un ácido de Lewis (usualmente, TMS-Tf o SnCl_4).

Esta metodología se denominó procedimiento de Vorbruggen²³ en honor a su principal impulsor. Como se mencionaba antes, el control de la estereoquímica en la serie de los ribonucleósidos se logra por asistencia anquimérica. La regioselectividad depende de la captura del intermedario ion oxonio por el nitrógeno más nucleofílico de la base, y consecuentemente se pueden formar una mezcla de regioisómeros.

²³ Ver por ejemplo: a) Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenc, C. *Organic Reactions.*, 2000, 55, 1, b) Vorbrüggen, H.; *Acc. Chem. Res.*, 1995, 28, 509 ,c) Vorbrüggen, H.; *Acta Biochim. Pol.*, 1996, 43, 25

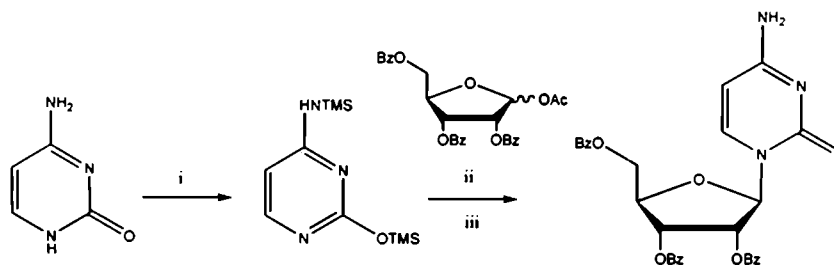


Figura 1.8. Ejemplo del método basado en bases sililadas para la síntesis de nucleósidos. (i) $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{NAC}$; (ii) $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{SiMe}_3$; (iii) H_2O

1.2.1.1- Control de la configuración anomérica en las reacciones de glicosidación:

En el caso de la glicosidación de azúcares con grupos acilo dirigidos hacia la cara α , la eliminación del grupo saliente en la posición 1 del azúcar, genera un carbocatión que es "capturado" por el oxígeno carbonílico del grupo acilo adyacente. Este intermediario bicíclico es preferencialmente atacado por la base nucleofílica, por la cara opuesta del anillo furanósico al sustituyente en la posición 2⁴ (Figura 1.9). Por lo que, para la síntesis de nucleósidos ribósidos se obtiene el anómero β , para los arabinósidos se obtiene el anómero α , y en el caso de los desoxirribonucleósidos, no está presente dicha asistencia, obteniéndose ambos anómeros. Un método alternativo para el control de la estereoselectividad involucra el uso de intermediarios de oxazolidinas. Éste es un método estereoespecífico con aplicaciones más generales, pudiéndose obtener mediante este tipo de metodologías β -arabinonucleósidos.

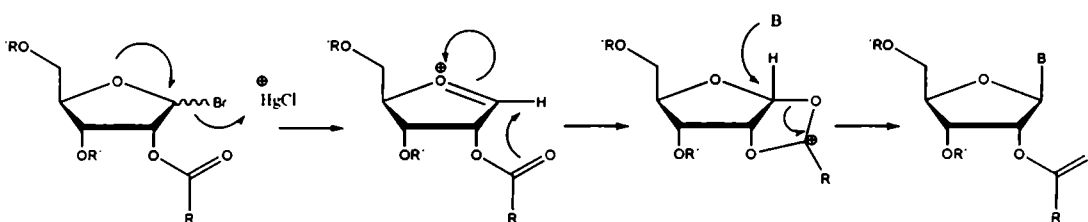


Figura 1.9. Bases mecánicas del control anquimérico. R= alquilo o arilo; R'=acetilo, bencilo, trimetilsililo; B= base heterocíclica (como sal de mercurio o sililada)

17 Capítulo 1. Introducción y objetivos

1.2.1.2- Estrategias para la síntesis estereo y regioselectiva de 2'-desoxirribonucleósidos

Como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de un sustituyente acetiloxi en la posición 2 en los desoxirribósidos, produce mezclas anoméricas en diferentes proporciones.

Una de las metodologías de glicosidación utilizadas para la obtención de los mismos con la configuración β , denominada el método de la sal de sodio, utiliza una sal de sodio de una base formada *in situ* y un α -haloazúcar como donador glicosídico. Para la síntesis de los 2'-desoxirribonucleósidos, la formación estereoespecífica del isómero- β requiere de vías S_N2 con exclusión de la anomerización del α -cloroazúcar. Este método no siempre conlleva a reacciones estereo ni regioespecíficas²⁶. Esta falta de selectividad en la reacciones de síntesis de 2'-desoxirribonucleosidos se presume que son debido a diferentes velocidades inducidas por los sustituyentes de la base, efectos estéricos y anomerización del α -cloroazúcar²⁷

Otro método de glicosidación aprovecha la asistencia anquimérica de sustituyentes en la posición tres del resto del carbohidrato. El grupo 3- α -hidroxilo en un 2-desoxiazúcar puede ser utilizado para agregar una nueva función, que puede participar en las reacciones de glicosidación. Esta estrategia asume que un grupo 3-O-director puede bloquear la cara α del azúcar y, por lo tanto, llevaría a la formación de β -nucleósidos, estereoselectivamente. Se han ensayado diversos grupos funcionales como directores en la reacción de glicosidación, como por ejemplo: 3-O-(2-metilsulfinil) etil, 3-C-metoxitiocarbonilmetil, 3-O- α -(N-benzoil)carbamoil, 3-O- α -tiocarbamil, entre otros. A continuación se muestra en la **Figura 1.10** un ejemplo de este tipo de asistencias anquiméricas de 3- α -sustituyentes²⁸.

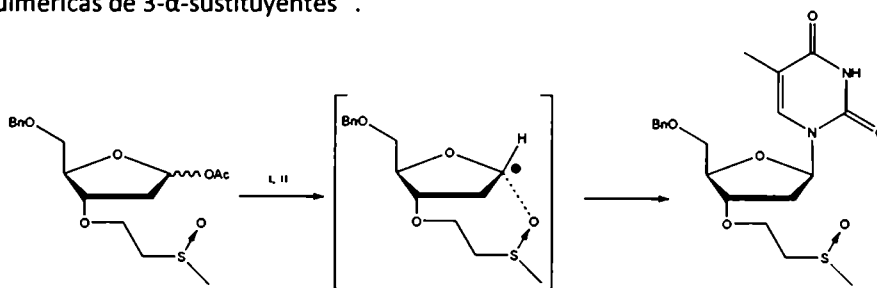


Figura 1.10. Asistencia anquimérica de 3- α -sustituyentes. (i) TMSOTf, CH_2Cl_2 ; (ii) Timina(TMS)₂

²⁴ Blackburn, M.; Gait, M.; *Nucleic acids in chemistry and biology*, oxford university press, 1996

²⁶ Kazimierczuk, Z.; Cottam, H. B.; Revankar, G. R.; Robins, R. K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106, 6379

²⁷ Revankar, G.; Robins, R.; *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acids*, 1989, 8, 709

²⁸ Lavalley, J.; Just, G.; *Tetrahedron Lett.*, 1991, 32, 3469-3472

18 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Alternativamente, la habilidad de controlar la regioselectividad en la síntesis de ribonucleósidos ha llevado a numerosos métodos para la preparación de 2'-desoxirribonucleósidos, por medio de reacciones de 2'-desoxigenación radicalarias, subsiguientes al paso de glicosidación. El método más utilizado involucra una reducción de Barton de derivados 2'-ticarbonatos²⁹.

1.2.3- Desventajas de la síntesis química clásica

Como corolario general de la sección precedente donde se describió la síntesis química de nucleósidos naturales y/o modificados por glicosidación, se pueden mencionar las siguientes limitaciones generales de esta metodología:

- rendimientos insatisfactorios,
- estéreo selectividad parcial con respecto a la posición anomérica, especialmente para los 2'-desoxirribonucleósidos,
- regioselectividad parcial,
- necesidad de utilizar reacciones de protección/desprotección con grupos químicos lábiles,
- posibles dificultades en la separación de mezclas complejas.

Se han planteado estrategias alternativas para la preparación de nucleósidos y sus análogos, que están basadas en el uso de reacciones catalizadas por enzimas o por microorganismos, que pueden ayudar a solucionar los problemas antes citados.

Esta aproximación presenta una serie de ventajas con respecto a la síntesis química tradicional, que serán discutidas en detalle más adelante en este capítulo.

²⁹ Takamatsu' S.; Katayama' S.; Hirose' N.; Naito. M.; Izawa, K.; *Tetrahedron Lett*, 2001, 42, 7605-7608

1.3- Síntesis quimio-enzimática de nucleósidos modificados

1.3.1- Biotransformaciones

1.3.1.1- Generalidades de las biotransformaciones

Se denomina biotransformación a todo aquel proceso en el que se utiliza como catalizador un microorganismo, tejido o bien una enzima aislada para la conversión de un sustrato en un producto.

El estado físico de estos biocatalizadores, así como la elección acerca de utilizar enzimas aisladas, microorganismos o tejidos depende del tipo de reacción a realizar, de la necesidad o no de co-factores y de la escala en que se va a desarrollar la biocatálisis. La presente tesis se centrará exclusivamente en la utilización de enzimas aisladas y en un caso particular, en el uso de tejidos vegetales, como biocatalizadores.

1.3.1.2- Enzimas utilizadas en procesos biocatalíticos

La gran mayoría de las enzimas empleadas en las biotransformaciones se utilizan en forma cruda y son accesibles a bajo costo, dado que los crudos suelen ser más estables y más económicos que las enzimas purificadas. En los últimos años, el desarrollo de las técnicas de sobreexpresión y purificación de proteínas ha provocado un aumento en la utilización de enzimas purificadas en dichas estrategias.

Las enzimas se obtienen mayoritariamente de fuentes microbianas³⁰. Así, un gran número de biocatalizadores se consiguen de bacterias u hongos por procesos de fermentación. Otra fuente muy importante de enzimas son ciertos órganosⁱ de mamíferos, como hígado o riñón. Sólo un pequeño porcentaje de enzimas se obtienen a partir de vegetales.

En la actualidad, se conocen más de 4000 enzimas, pero esta cantidad representa un porcentaje muy pequeño de las que existen en la naturaleza. Alrededor de un 10 % de esta cantidad han sido investigadas y son accesibles comercialmente, lo que da una idea del grado de desarrollo que aún es posible en este campo.

³⁰ White, J.; White, D.; *Source Book of enzymes*, CRC Press, Boca Raton, 1997

20 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Las enzimas se clasifican de acuerdo al tipo de reacción de transferencia, el grupo dador y el grupo aceptor, reconociéndose seis grupos principales con sus respectivas subclases, que se citan a continuación:

1. Oxidoreductasas: catalizan reacciones de oxido-reducción, es decir la transferencia de átomos de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro.
2. Transferasas: catalizan la transferencia de grupos funcionales (distintos de hidrógeno) de un sustrato a otro.
3. Hidrolasas: catalizan reacciones de hidrólisis.
4. Liasas: catalizan reacciones de ruptura (por vías no hidrolíticas) o formación de enlaces de un sustrato.
5. Isomerasas: catalizan la interconversión de isómeros estructurales, de posición u ópticos, de una a otra forma.
6. Ligasas: catalizan la unión de dos sustratos con hidrólisis simultánea de un nucleósido trifosfato.

1.3.1.3- Las ventajas de las reacciones biocatalizadas contra la síntesis química clásica

El uso de biocatalizadores para la síntesis de productos, conlleva a una serie de ventajas y desventajas, con respecto a la síntesis química clásica.

Ventajas

- La principal ventaja es la mayor selectividad. Las reacciones enzimáticas, por lo general, son altamente regio, estereo y quimio selectivas. Esta selectividad facilita la síntesis, obteniéndose en general, los isómeros deseados, sin el uso de complejos y tediosos pasos de protección y desprotección. Asimismo, la obtención preferencial de un único isómero, facilita los procesos de purificación.
- Las enzimas son medioambientalmente "amigables". En primera medida las enzimas trabajan en condiciones suaves de pH, temperatura y presión. Generalmente son activas a temperatura ambiente, presión atmosférica y pH neutro o cercano a la neutralidad. Estas condiciones minimizan la generación de subproductos por reacciones colaterales, lo que

21 Capítulo 1. Introducción y objetivos

conlleva a un aumento de la conversión y facilita, a su vez, los procesos de recuperación de productos. Asimismo, las condiciones de trabajo implican un bajo consumo energético, y por lo general son síntesis de bajo costo y con emisión de gases poco contaminantes. En último lugar, son catalizadores biodegradables.

- Las enzimas son catalizadores muy eficientes. En general, se logran mayores velocidades a concentraciones más bajas de catalizador con respecto a la catálisis inorgánica. Si consideramos las condiciones de su uso (T, presión) su eficacia es aún mayor.
- Las enzimas pueden catalizar un amplio espectro de reacciones.

Desventajas

- Las enzimas requieren parámetros operacionales muy estrechos. En general no toleran pHs, temperaturas o presiones extremas, los cuales son necesarios, en algunos casos, como por ejemplo para la solubilización de sustratos.
- Las enzimas presentan su mayor actividad en medios acuosos. Se dificulta así, la síntesis de productos orgánicos poco solubles en dichos medios.
- Las enzimas pueden sufrir procesos de inhibición. Dicha inhibición puede ser debida al sustrato o al producto formado. En el caso de inhibición por sustrato, se debe mantener la concentración del mismo baja, lo cual dificulta en gran medida el escalado de reacciones. En el caso de inhibición por producto, se debe retirar el producto a medida que se forma, lo cual encarece el escalado de la reacciones.
- Las enzimas pueden requerir cofactores, necesarios de regenerar. Algunos cofactores, como por ejemplo el ATP, son de precios elevados, lo cual encarece la síntesis del producto.

Si bien la biocatálisis es un área de gran utilidad para la síntesis química, las desventajas antes mencionadas ponen de manifiesto que no suplantará la síntesis química tradicional, sino más bien, se transformará en una herramienta más, dentro del arsenal sintético de la química orgánica.

1.3.2- Estrategia propuesta para la síntesis quimio-enzimática de nucleósidos naturales y/o nucleósidos modificados.

En el particular caso de síntesis de nucleósidos, debido a los inconvenientes descriptos para su síntesis química clásica (manipulación de múltiples grupos funcionales, baja regio y estereoespecificidad, rendimientos poco satisfactorios y procesos complejos de purificación de isómeros) se han desarrollado estrategias biotecnológicas o quimio-enzimáticas, aprovechando la elevada regio, quimio y estéreselectividad de las enzimas, junto con las ventajas adicionales antes descriptas.

Una enzima muy estudiada en la síntesis de nucleósidos es la nucleósido fosforilasa (NP, E.C. 2.4.2.), que cataliza la fosforólisis reversible de ribo y desoxirribonucleósidos, obteniéndose α -D-ribosa- o α -D-desoxiribosa 1-fosfato y la base como productos³¹. En algunos casos, la adición de otra base resulta en la formación de un nuevo nucleósido, esta es la denominada reacción de transglicosidación. El resultado final de las transglicosidaciones catalizadas con NPs es la transferencia del residuo ribosídico o desoxirribosídico de un nucleósido a diversas bases naturales o análogas, a través del intermediario furanosa 1-fosfato (F-1-P)(Figura 1.11). Estas bioconversiones son absolutamente regio y estéreselectivas lo que implica que el azúcar es correctamente transferido a los átomos N-1 y N-7 (para purinas y pirimidinas respectivamente) y se forma únicamente el isómero β . Se han empleado este tipo de enzimas para la síntesis de nucleósidos modificados tanto en la base como en el azúcar o bien modificada en ambos residuos. Ejemplos de este tipo de metodologías sintéticas se detallará más adelante en este capítulo.

Se han empleado generalmente dos procedimientos básicos para llevar a cabo las glicosidaciones en presencia de NPs:

- a) Aislamiento de la F-1-P formada y su subsiguiente uso como donador glicosídico en la reacción de acoplamiento a la base aceptora³²
- b) Intercambio de una base por otra, en procedimientos *one-pot* en presencia de cantidades catalíticas de fosfato inorgánico (Figura 1.11).

Este último procedimiento se prefiere por su simplicidad operacional, aunque se encuentra limitado debido a que en algunas ocasiones, la base liberada a partir del donador glicosídico puede unirse más fuertemente a la enzima que la base aceptora, resultando en una

³¹ Lewkowicz, E; Iribarren, A.; *Curr. Org. Chem.*, **2006**, *10*, 1197

³² Anderson, J.; Cottam, H.; Larson, S.; Dee Nord, L.; Revankar, G.; Robins, R.; *J. Heterocyclic Chem.*, **1990**, *27*, 439

23 Capítulo 1. Introducción y objetivos

inhibición competitiva. El problema de la inhibición puede resolverse mediante el uso de un sistema enzimático acoplado.

Se ha demostrado que *In vivo*, la fosforólisis se encuentra altamente favorecida sobre la síntesis, debido al acoplamiento de las NPs con enzimas de otros caminos metabólicos. Sin embargo, se ha reportado que en el caso de las purín nucleósido fosforilasas (PNPs), el equilibrio termodinámico se encuentra desplazado hacia la síntesis de nucleósidos, mientras que, para las pirimidín nucleósidos fosforilasas (PyNPs), esta favorecido el paso fosforolítico³¹. Por lo que, generalmente, las reacciones de transglicosidación enzimática utilizando NPs se realizan mediante el acoplamiento de una pirimidín nucleósido fosforilasa con una purín nucleósido fosforilasa, utilizando un nucleósido pirimidínico como donador glicosídico y una base purínica como aceptor³⁴. (Figura 1.11).

Estas biotransformaciones han sido llevadas a cabo empleando las enzimas purificadas en solución (o inmovilizadas) o bien empleando células enteras de microorganismos que contienen altos porcentajes de las enzimas requeridas³⁸. Se ha encontrado que las NPs aceptan un amplio rango de análogos de nucleósidos como sustratos con modificaciones tanto en la base como en el componente glicosídico.

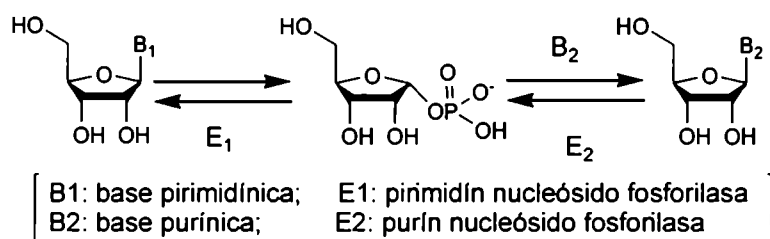


Figura 1.11. Esquema de la transglicosidación en la síntesis de nucleósidos

En particular, la síntesis de nucleósidos modificados en el azúcar ha sido llevada a cabo por el uso de donores glicosídicos modificados. Ésta es la principal limitación de la metodología, donde además de encontrar las enzimas capaces de aceptar dicho donador glicosídico no natural, se debe disponer del nucleósido donador del azúcar, con la modificación deseada.

³⁴ Rideout, J.; Krenitsky, T.; Koszalka, G.; Cohn, N.; Chao, E.; Elion, G.; Latter, V.; Williams, R.; *J. Med. Chem.*, **1982**, 25, 1040

³⁸ ver por ejemplo a) Utagawa et al. *Agric. Biol. Chem.*, **1985**, 49, 2339; b) Utagawa, T.; *J. Molec. Catalysis B: Enzymatic*, **1999**, 6, 215, 222, c) Citticeli, G. et al., *Nucleosides Nucleotides*, **1999**, 18, 1135

24 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Debido principalmente a la limitación de la síntesis de nucleósidos modificados en el azúcar se han evaluado nuevas rutas de preparación. Una alternativa es la síntesis de nucleósidos partiendo directamente del intermediario F-1-P para la reacción de acoplamiento; es decir el donador glicosídico ya no es un nucleósido sino un azúcar fosforilado. La desventaja de esta aproximación está dada por la dificultad en la preparación de la F-1-P y por su pobre estabilidad en las condiciones de reacción³⁹.

Una alternativa para este problema involucra el acoplamiento de las enzimas anteriormente citadas (NPs) con otra enzima denominada fosfopentomutasa (PPM, E.C. 5.4.2.7.). Esta enzima cataliza la transferencia estereoselectiva de un grupo fosfato entre los hidroxilos de las posiciones 5 y 1 de la ribosa, desoxirribosa y análogos (Figura 1.12). Esta aproximación tiene la ventaja de utilizar furanosas 5-fosfato (F-5-P) como materiales de partida. Éstos azúcares fosfato son más sencillos de preparar y son más estables que los correspondientes α -F-1-P. La F-1-P es generada *in situ* a partir de la F-5-P, la cual es sustrato de la NP para la posterior reacción de acoplamiento con la base. Existen pocos ejemplos sintéticos que utilizan esta ruta alternativa, centrándose éstos únicamente en la síntesis de desoxirribonucleósidos, detallados a continuación.

El objetivo general de este trabajo de tesis ha sido generar una estrategia versátil y económica para la síntesis tanto de nucleósidos naturales como de nucleósidos modificados partiendo de los azúcares naturales. La aproximación quimioenzimática de síntesis de nucleósidos que se decidió explorar en este trabajo de tesis se encuentra resumida en la Figura 1.12

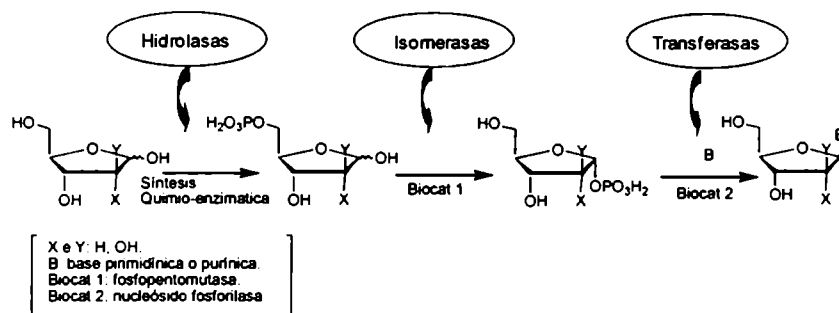


Figura 1.12 Obtención quimio-enzimática de nucleósidos y/o nucleósidos modificados.

³⁹ ver por ejemplo a) Otto, J.; Werkman C.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, 69, 264, b) Duskocil, J.; Holy, A.; *Collect Czech. Chem. Commun.*, 1997, 42, 370

25 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Esta aproximación puede separarse en dos partes:

Parte I: Síntesis quimio-enzimática de furanosas 5-fosfato.

La hipótesis básica de la estrategia enzimática utilizando las enzimas PPM y NPs está asociada a la disponibilidad de las correspondientes F-5-P como materiales de partida. La obtención enzimática de estos compuestos implica la utilización de agentes donores de grupos fosfato caros como por ejemplo ATP o fosfoenolpiruvato. La preparación química de estas moléculas en general presenta dificultades asociadas al esquema de protección-desprotección de los grupos hidroxilos de la furanosa.

En este sentido presentaremos el desarrollo de una estrategia general de obtención de furanosas 5-fosfato utilizando un esquema de protección química y desprotección selectiva con lipasas combinado con una fosforilación química.

Las enzimas utilizadas para el esquema de protección-desprotección selectiva fueron:

- Lipasa de *Candida antártica* (CAL-B)
- Lipasa de *Candida rugosa* (CRL)
- Hidrolasas de tejido vegetal (porciones de banana)

Parte II: Síntesis enzimática de nucleósidos partiendo de furanosas 5-fosfato y una base (natural o modificada)

Con las F-5-P en mano, se exploró la reacción de síntesis enzimática de nucleósidos mediante el acoplamiento de las NPs con la PPM; para lo cual se utilizaron las siguientes enzimas:

- Nucleósido fosforilasas:
 - Purín nucleósido fosforilasa de origen bacteriano
 - Timidín nucleósido fosforilasa de *E. Coli*.
- Fosfopentomutasa de *E.coli*

1.3.3- Parte I: Síntesis quimio-enzimática de furanosas 5-fosfato.

La obtención de furanosas con la posición 5 libre a partir de los azúcares correspondientes es un paso fundamental en la obtención de furanosas 5-fosfato. Asimismo, la obtención selectiva de furanosidos con otras posiciones libres puede ser útil para la síntesis de sintones en la preparación de diversos análogos de azúcares, que pueden ser utilizados para diversas

26 Capítulo 1. Introducción y objetivos

aplicaciones sintéticas. En particular, una vez modificada la posición libre, este análogo puede ser fosforilado en la posición 5 y posteriormente utilizado como posible sustrato de la PPM/NP en la síntesis de nucleósidos modificados en el azúcar. La preparación de estas furanosas con un único hidroxilo libre requiere de numerosos pasos si se desean obtener mediante métodos clásicos de síntesis química como consecuencia de la presencia de varios grupos hidroxilos libres de similar reactividad⁴⁰.

Aunque existen varias técnicas químicas disponibles para proteger o liberar grupos hidroxilos en carbohidratos⁴¹, los métodos enzimáticos ofrecen una alternativa económica y ambientalmente amigable, presentando una notable regioselectividad⁴².

La accesibilidad comercial y versatilidad sintética de muchas enzimas hidrolíticas ha estimulado el estudio de reacciones de protección-desprotección de azúcares, especialmente reacciones de acilación-desacilación de monosacáridos.

1.3.3.1- Enzimas utilizadas en la reacción de acetilación-desacetilación de azúcares:

Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas E.C. 3.1.1.3.) son enzimas que catalizan la hidrólisis de aceites y grasas con la subsiguiente formación de ácidos grasos libres, digliceroles, monogliceroles y glicerol. Estos biocatalizadores se distribuyen en animales, plantas y microorganismos como enzimas digestivas que facilitan el transporte, la deposición y la movilización de las grasas. Además, juegan un papel fundamental en el metabolismo intracelular de lípidos y en el funcionamiento de membranas biológicas⁴³.

Las lipasas son utilizadas como fármacos en desórdenes digestivos y enfermedades del páncreas. Se emplean también como aditivos de detergentes y como catalizadores en la industria oleoquímica y alimentaria, sin olvidar su función como catalizadores en síntesis orgánica.

Presentan un elevado potencial sintético en contraste con otras enzimas, ya que no requieren de cofactores y son capaces de aceptar una amplia variedad de sustratos. Así, las lipasas

⁴⁰ Garg, R.; Gupta, S.; Gao, H.; Babu, M.; Debnath, A.; Hansch, C.; *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 3525

⁴¹ Ver por ejemplo Ishido, H.; Sakairi, N.; Sekiya, M.; Nakazaki, N.; *Carbohydr. Res.*, **1981**, *97*, 51

⁴² Kadereit, D.; Waldman, H.; *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3367

⁴³ Schmid, R.; Verger, R.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 1608

27 Capítulo 1. Introducción y objetivos

pueden acomodar ésteres alifáticos, aromáticos, bicíclicos e incluso ésteres de compuestos organometálicos, entre otros⁴⁴.

Una gran variedad de estos biocatalizadores son producidos por bacterias u hongos y son excretados como enzimas extracelulares, por lo que su producción a gran escala es un proceso relativamente sencillo, lo que los convierte en biocatalizadores económicos.

La mayoría de las lipasas existen en los organismos en forma de dos isoenzimas (A y B), que generalmente presentan variaciones en la enantioselectividad de las reacciones que catalizan. Las preparaciones de las lipasas crudas contienen las dos isoenzimas, salvo en el caso de la lipasa de *Candida antártica*, donde se han conseguido separar a través de procesos de ingeniería genética. Sólo unas pocas lipasas han conseguido aislarse de mamíferos.

Una característica fundamental de las lipasas, que las diferencia de otras hidrolasas y las convierte en las enzimas con mayor potencial sintético, es la interacción que presenta con los sustratos. La catálisis en medio acuoso con lipasas presenta muy baja actividad con sustratos hidrosolubles, pero cuando la concentración del sustrato es tan alta que sobrepasa el límite de solubilidad formando una segunda fase lipofílica, se produce un gran incremento en la actividad de la misma. Esta propiedad se conoce como activación interfacial⁴⁵. Esto es debido a que estas enzimas contienen una "tapa" que consiste en un *loop* superficial de la proteína que cubre el sitio activo y se aleja del mismo al estar en contacto con la interfase⁴⁶. El hecho de que las lipasas durante la catálisis estén expuestas a una fase lipídica demuestra que son capaces de trabajar en entornos hidrofóbicos manteniendo su actividad. Por ello, es posible reemplazar el nucleófilo natural de las lipasas (agua) por una gran variedad de nucleófilos orgánicos como alcoholes, aminas, tioles, etc.

Las lipasas son capaces de catalizar la esterificación selectiva entre ácidos y alcoholes. También intervienen en reacciones de transesterificación, procesos en los que se produce un intercambio de radicales acilo entre un éster y un ácido, un éster y otro éster o un éster y un alcohol (alcoholisis), entre otras.

Independientemente de las diferencias de tamaño, secuencia de péptidos, sustratos, activadores, inhibidores y otras propiedades, las lipasas que han conseguido ser elucidadas hasta la fecha adoptan la misma estructura, conocida como el pliegue de α/β hidrolasa, que consta de una serie de hebras paralelas β rodeadas por hélices α . Una secuencia de aminoácidos aparece en

⁴⁴ Gandhi, N.; *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **1997**, *74*, 621-634

⁴⁵ Verger, R; *Trends. Biotechnol.* **1997**, *15*, 32-38

28 Capítulo 1. Introducción y objetivos

todas las lipasas, el pentapéptido Gli-X-Ser-Y-Gli (donde X e Y son residuos variables). La conservación de esta serina y la pérdida de actividad que se produce cuando se modifica o reemplaza, indica que este aminoácido es crucial para la catálisis. Además de la serina catalítica, el centro activo de las lipasas consta de Histidina (His) y de otro aminoácido que puede ser ácido aspártico (Asp) o glutámico (Glu). Estos tres residuos forman la triada catalítica⁴⁷ que se encuentra en una cavidad conocida como hueco hidrofóbico de la enzima.

Lipasa de *Candida antártica*

Es una de las lipasas más versátiles empleadas en el campo de las biotransformaciones. Existen dos isoenzimas de esta lipasa, la forma A y la B. La especificidad de sustrato entre estas isoenzimas presenta grandes diferencias, la correspondiente CAL-B es muy activa frente a una gran variedad de sustratos no naturales mientras que la CAL-A tiene una menor versatilidad. Asimismo la isoenzima B es menos termotolerante que la correspondiente forma A⁴⁸.

La enzima CAL-B no presenta activación interfacial y es muy poco activa frente a triglicéridos de cadena larga. Ésta se presenta en diferentes preparados comerciales que difieren en el soporte sobre el que se incorpora la enzima. El preparado comercial empleado en esta tesis es el comercializado por Novo Nordisk como "novozym 435" donde la enzima está soportada en una resina de nombre comercial "Lewatit E". Una de las ventajas de este preparado es que es más estable térmicamente que la enzima nativa⁴⁹.

Lipasa de *Candida rugosa*

Se ha elucidado la estructura de la lipasa de *Candida rugosa*, mostrando que posee un hueco hidrofóbico y presenta activación interfacial. A su vez, se ha determinado la presencia de tres isoformas mayoritarias en el preparado comercializado por Sigma (utilizado en esta tesis) denominadas LipA y LipB, LipC, probablemente difieren en el grado de glicosidación⁵⁰.

⁴⁶ Jaeger, K.; Dijkstra, B.; Reetz, M., *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, *53*, 315

⁴⁷ Brady, L.; Brzozowski, A.; Derewenda, E.; Dodson, D.; Tolley, S.; Turkenburg, J.; Christiansen, L.; Høge-Jensen, B.; Nørskov, L.; Thim, L.; Menge, U.; *Nature*, **1990**, *343*, 767

⁴⁸ Kira, O.; Chistensen, M.; *Org. Proc. Res. And Devel.*, **2002**, *6*, 446

⁴⁹ Arroyo, M.; Sánchez-Montero J.; Sinisterra.; *J. Enzym. Microb. Technol.*, **1999**, *24*, 3

⁵⁰ Lopez, N.; Pernas, M.; Pastrana, L.; Sanchez, A.; Valero, F.; Rúa, M.; *Biotechnol. Prog.*, **2004**, *20*, 65

29 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Existen pocos estudios en los cuales se haya determinado distinta reactividad entre las distintas isoformas de la lipasa comercial de CRL de Sigma. En un estudio publicado por Shaw y Chang⁵¹ se observó la existencia de diferentes actividades enzimáticas de las isoformas separadas, con respecto a la variación de la longitud de la cadena del grupo acilo del éster hidrolizado. Se observó que triacilglicéridos cortos, medios y largos eran preferidos como sustratos para la LipB, LipC, LipA, respectivamente. Las tres isoformas tienen una actividad óptima a 35-40°C y pH 7-8. Aunque estas isoformas presenten diferencias tanto en la reactividad como en la selectividad, en las reacciones biocatalizadas de esta propuesta se utilizó el preparado comercial que contiene la mezcla de las mismas.

1.3.3.2- Antecedentes del uso de hidrolasas en las reacciones de acetilación-desacetilación de azúcares

La accesibilidad y la versatilidad de las enzimas hidrolíticas ha estimulado el estudio de reacciones de acetilación-desacetilación de azúcares, especialmente en anillos piranósicos⁵² utilizando lipasas como biocatalizadores. Como un ejemplo, la desacetilación enzimática de la α -glucopiranosas peracetilada utilizando como biocatalizador la enzima lipasa de *Candida rugosa* (CRL) a pH ácidos, proporcionó el producto monodesacetilado en la posición 6, regioselectivamente y con alto rendimiento, mientras que el isómero β dio el producto desacetilado en la posición 1 con bajo rendimiento. Por otro lado, la hidrólisis de las metil glucopiranosas acetiladas dió para ambos anómeros ensayados el producto desacetilado en la posición 6 en menores tiempos de reacción⁵³.

Los monosacáridos furanósicos no han sido tan estudiados como sus contrapartes piranósicas. En este sentido, Wong y colaboradores⁵⁴ desarrollaron reacciones de acetilación-desacetilación regioselectiva utilizando la CRL comercial como biocatalizador. Estos ensayos mostraron una absoluta regioselectividad hacia la 5-desacetilación para el caso de metil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-ribofuranósidos y metil 2,3,5-tri-O-acetil- α -D-arabinofuranósidos. Más

⁵¹ Shaw, J.; Chang, C.; *Biotechnology Letters*, **1989**, *11*, 779

⁵² Ver por ejemplo: a) Hennen, J.; Sweers, H.; Wang, Y.; Wong, C.; *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 4939, c) Horrobin, T.; Hao, C.; Crout, D.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1998**, *1*, 1069

⁵³ Terreni, M.; Salvetti, M.; Linati, L.; Fernández-Lafuente, R.; Fernández-Lorente, G.; Bastida, A.; Guisan, J.; *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1615

⁵⁴ Hennen, J.; Sweers, H.; Wang, Y.; Wong, C.; *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 4939

30 Capítulo 1. Introducción y objetivos

recientemente se aplicaron las mismas condiciones al 1,2,3,5-tetra-*O*-acetil- β -D-ribofuranosido⁵⁵, obteniéndose el correspondiente producto desacetilado en la posición primaria, o sea en el C-5, con un 80 % de rendimiento. Por otra parte, Kim y colaboradores⁵⁷ reportaron en una publicación reciente, que el grupo acetilo en la posición 2 del metil 2,3,5,tri-*O*-acetil- α -D-arabinofuranósido era regioselectivamente hidrolizado con elevados rendimientos utilizando la esterasa comercial de hígado de cerdo y la de *Rhizopus oryzae*.

A su vez, nuestro grupo ha reportado⁵⁸ que la desacetilación enzimática del metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α -D-ribofuranósido utilizando CAL-B, fue totalmente regioselectiva, obteniéndose el metil 2,3-tri-*O*-acetil- α -D-ribofuranósido con elevados rendimientos. La desacetilación del correspondiente anómero β no fue regioselectiva, obteniéndose diversos productos de desacetilación. Por último, en otra publicación del grupo⁵⁹ se reportó la preparación diastereoselectiva del metil 3-*O*-acetil-2-desoxi- α -D-ribofuranósido, 1,3-di-*O*-acetil- α -D-ribofuranósido y 1,2,3-tri-*O*-acetil- α -D-arabinofuranósido a partir de mezclas anoméricas de los correspondientes compuestos 5-acetilados, a través de reacciones de alcoholisis enzimática catalizada por CAL-B.

Relacionado al uso de hidrolasas de origen vegetal, si bien no existen antecedentes utilizando sustratos derivados de carbohidratos, se ha reportado la hidrólisis de 1-acetoxi-2-metilciclohexeno utilizando raíces de zanahoria como biocatalizador⁶⁰. Dado que se conoce que ciertas frutas presentan actividad hidrolítica⁶¹, se decidió explorar en esta propuesta de tesis doctoral, el uso de tejidos vegetales, en particular porciones de banana, como biocatalizadores en la hidrólisis de alquil tri-*O*-acetilribo-, arabino- y xilofuranósidos. A nuestro leal entender, no existen reportes de hidrólisis regioselectivas utilizando tejido vegetal.

⁵⁵ Chien, T.; Chern, J.; *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 1215

⁵⁷ Jun, S.; Moon, M.; Lee, S.; Cheong, C.; Kim, K.; *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46

⁵⁸ Iñigo, S.; Taverna Porro, M.; Monserrat, J.; Iglesias, L.; Iribarren, A.; *J. mol. Cat. B*, **2005**, 35, 70

⁵⁹ Gudiño, E.; Iribarren, A.; Iglesias, L.; *Tetrahedron: Assym.*, **2009**, 20, 80

⁶⁰ Bruni, R.; Fantin, G.; Medici, A.; Pedrini, P.; Saccheti, G.; *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 3377

⁶¹ Bailey, M.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1912**, 36, 1706

1.3.4- Parte II: Síntesis enzimática de nucleósidos modificados

1.3.4.1- Generalidades

La biosíntesis de nucleósidos y/o nucleótidos, compuestos vitales para todos los procesos bioquímicos, puede proceder a través de dos caminos: 1) síntesis *de novo*, en la cual participan una variedad de aminoácidos y otros precursores, y 2) ruta de salvataje, en la que nucleósidos y bases preexistentes son utilizados como precursores en la producción de nuevos nucleósidos y/o nucleótidos. En esta última, los productos secundarios actúan como fuentes de carbono, nitrógeno y energía, vía la conversión de los intermediarios ribo o desoxirribosídicos, los cuales pueden ingresar a la ruta de las pentosas fosfato y glicólisis (Figura 1.13).

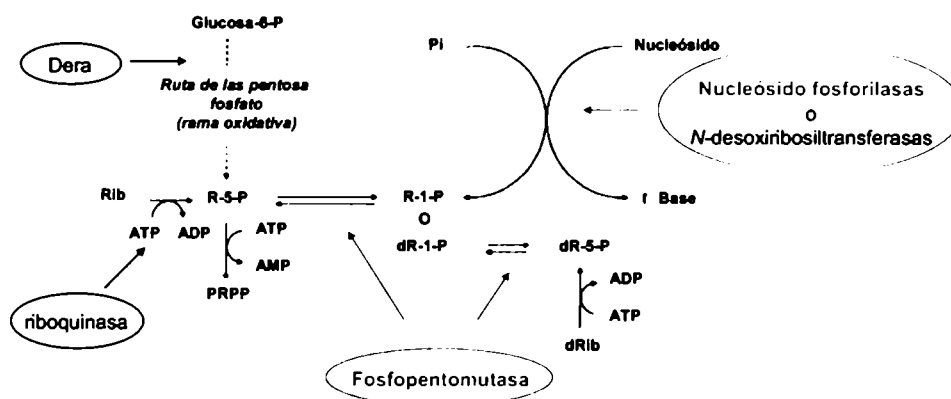


Figura 1.13. Biosíntesis de nucleósidos por la ruta de salvataje.

1.3.4.2- Nucleósido fosforilasa

La ruptura del enlace glicosídico en la ruta de salvataje es catalizado por las enzimas denominadas nucleósido fosforilasa (NPs) mediante un mecanismo fosforolítico. Las enzimas NPs son indispensables en el metabolismo de nucleósidos y/o nucleótidos, ya que controlan los niveles celulares de los mismos y de las bases libres catalizando su interconversión. Estas enzimas actúan mediante la fosforólisis de nucleósidos purínicos y pirimidínicos, proceso en el cual la unión glicosídica C-N es escindida, generándose la base libre y F-1-P. El descubrimiento de las enzimas responsables de esta ruptura ha sido atribuido a Levene y Medigresceanu⁶². Posteriormente, en

⁶² Levene, P.; Medigresceanu, F.; *J. Biol. Chem.*, 1911, 9, 65

Capítulo 1. Introducción y objetivos

1924, se publicaron las propiedades generales y los métodos de purificación de las NPs, demostrándose que la ruptura enzimática del enlace glicosídico podía ser realizada por dos tipos de enzimas, una específica para purinas (PNP) y otra para pirimidinas (PyNP)⁶³. En 1945, Kalckar⁶⁴ demostró que uno de los productos de la fosforólisis era la R-1-P. De esta forma, se planteó un mecanismo en el cual el fosfato inorgánico atacaba a la posición 1' del azúcar por la cara opuesta a la base, obteniéndose el isómero α -R-1-P.

Posteriormente estudios sobre la PyNP sugirieron la presencia de dos PyNP: una específica para timidina (timidín fosforilasa, TP), no activa sobre la uridina, y otra para uridina⁶⁵ (uridín fosforilasa, UP), no activa para la timidina.

A pesar de la baja homología en la secuencia entre las NPs de distintos orígenes, estudios estructurales demuestran que estas enzimas podrían dividirse en dos grandes familias según el plegamiento que presentan:

- NP-1: Presentan una estructura cuaternaria trimérica o hexamérica y aceptan como sustratos nucleósidos purínicos y algunos pirimidínicos. A esta familia pertenecen las enzimas PNP y UP.
- NP-2: Presentan una estructura cuaternaria dimérica y aceptan timidina y uridina. A esta familia pertenecen las enzimas TP.

Se han descubierto otras enzimas que rompen el enlace glicosídico, como por ejemplo las nucleósido hidrolasas (E.C. 3.2.2.), las nucleósido desoxirribosil transferasas (E.C. 2.4.2.) y las fosforribosil transferasas (E.C. 2.2.4.). En la próxima sección sólo se describirán las NPs ya que son las que han sido utilizadas en esta tesis.

Purín nucleósido fosforilasas (PNPs)

Se han identificado PNPs con distintas especificidades y en algunas instancias han sido purificadas de un amplio rango de organismos. Se pueden clasificar en dos grandes categorías⁶⁶, según presentan diferencias en su estructura cuaternaria, su peso molecular y las especificidades con respecto a los sustratos, entre otras propiedades.

⁶³ Levene, P.; Weber, I.; *J. Biol. Chem.*, **1924**, 60, 707

⁶⁴ Kalckar, H.; *J. Biol. Chem.*, **1945**, 158, 723

⁶⁵ Ver por ejemplo a) Friedkin, .; Roberts, D.; *J. Biol. Chem.*, **1954**, 207, 245, b) Paegle, L.; Schlenk, F.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1952**, 40, 42

33 Capítulo 1. Introducción y objetivos

- PNP de bajo peso molecular:
 - Son homotrímeros ($M_r \sim 80-100$ kDa).
 - Específicos para la catálisis de 6-oxo purinas y sus nucleósidos; y algunos análogos. Precisan para la actividad purinas sustituidas con un grupo 6-ceto o algún grupo con propiedades electrónicas similares (ej. S), un protón en el N-1 y sólo toleran sustituyentes donores de protones en el C-2.
 - Han sido aisladas de mamíferos y de algunos microorganismos tales como *Bacillus stearothermophilus* y *Cellulomonas*.

- PNP de alto peso molecular
 - Son homohexámeros ($M_r \sim 110-160$ kDa).
 - Poseen una menor especificidad que las de bajo peso molecular aceptando como sustratos tanto a 6-oxopurinas como a 6-aminopurinas y sus nucleósidos.
 - Son las encontradas generalmente en microorganismos.

Con respecto a la especificidad de las PNP de ambas clases, se puede resumir que las de bajo peso molecular exhiben una especificidad más estricta para la base y una menor especificidad para el azúcar que las correspondientes de alto peso molecular.

En esta tesis se ha trabajado con la enzima PNP comercializada por Sigma, cuyo origen es descrito como "bacteriano" sin aclarar la cepa correspondiente (Sigma se niega a divulgar el origen de la misma). Ésta ha sido asumida en muchos trabajos como de *E. coli*. (PNP de alto peso molecular). Sin embargo, Bzowska et al.⁶⁶ han sugerido otro origen basándose en las especificidades por los sustratos y su peso molecular, indicando que se trataría posiblemente de la PNP de *Cellulomonas* (PNP de bajo peso molecular).

La enzima PNP de *Cellulomonas* ha sido cristalizada y su estructura dilucidada por cristalografía de rayos X, revelando que al menos en su forma de cristal, esta enzima se presenta como un homotrímero y es un miembro de la clase de PNP de bajo peso molecular⁶⁷. Asimismo, se ha demostrado que la reacción de fosforólisis de adenosina no es detectable, mientras que la

⁶⁶ Bzowska, A.; Kulikowska, E.; Shugar, D.; *Pharmacol. Ther.*, **2000**, *88*, 349

34 Capítulo 1. Introducción y objetivos

adenina sí es sustrato de la reacción inversa, pero con una menor velocidad que con la hipoxantina⁶⁸.

Esta enzima tiene un pH óptimo de trabajo en el rango de 6-8.5, pero posee una excepcional estabilidad a pHs más básicos, siendo estable a pH=11 por una hora. Adicionalmente, a diferencia de muchas PNPs de bajo peso molecular, es excepcionalmente termoestable⁶⁹, no perdiendo actividad hasta 60 °C.

Timidín fosforilasas (TPs)

Hasta el día de hoy, todas las enzimas TPs aisladas y caracterizadas son dímeros, con una masa molecular en el rango de 80-110 KDa. La estructura detallada de la TP de *E. coli* obtenida por cristalografía de rayos X fue presentada por primera vez en 1990⁷⁰. Ésta mostró que cada subunidad contiene un amplio dominio $\alpha\beta$, y un dominio más pequeño α , entre los cuales se encuentra el sitio activo. Éste consta de dos sitios de unión a sustrato, en uno se une el nucleósido y en el segundo el fosfato. Se concluyó que la discriminación entre diversos nucleósidos se asocia a efectos estéricos⁶⁴.

La enzima TP de *E. coli* es específica, con respecto a los azúcares, para la 2-desoxirribosa 1-fosfato, mientras que la especificidad por las bases pirimidínicas es menos estricta, siendo sustratos de la misma las bases naturales timina y uracilo. Se ha reportado que el sustituyente de la posición 5 del anillo pirimidínico puede ser intercambiado por hidrógeno, metilo o amino con efectos despreciables en los valores de actividad⁷¹. En el caso de la síntesis de nucleósidos utilizando bases tipo 5-halogenouracilo, se determinó que disminuye significativamente la actividad en comparación con la utilización de timina⁷². Este efecto se debe al reemplazo en la posición 5 por un sustituyente voluminoso, dificultando estéricamente la unión de la base modificada al centro activo de la TP. Sin embargo otros sustituyentes en la posición 5 del uracilo pueden no ser sustratos de la misma, como ocurre en el caso de los grupos 5-tio y 5-hidroximetilo.

⁶⁷ Tebbe, J.; Bzowska, A.; Wielgus-kutowska, B.; Zazimierczuk, Z.; Schroder, W.; Shugar, D.; Saenger, W.; Koellner, G; *J. Mol. Biol.*, **1999**, 294, 1239

⁶⁸ Hennen, W.; Wong, C.; *J. Org. Chem.*, **1989**, 54: 4692

⁶⁹ Wielgus-Kutowska, B.; Tebbe, J.; Schroder, W.; Shugar, D.; Saenger, W.; Koellner, G, Bzowska, A.; *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1998**, 431, 259

⁷⁰ Walter, M.; Cook, W.; Cole, L.; Short, S.; Koszalka, G.; krenitsky, T.; Ealick, S.; *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 14016

⁷¹ a) Razzel, E.; Khorana, H.; *Biochim. Et Biophys. Acta*, **1958**, 28, 562, b) Razzel, E.; Casshyap, P.; *J. Biol. Chem.*, **1964**, 239, 1789

⁷² Panova, N.; Alexeev, C.; Kusmichov, A.; Shchevelva, E.; Gavryshov, K.; Polyakov, A.; Kritzyn, A.; Esipov, R.; Miroshnikov, A.; *Biochemistry*, **2007**, 72, 21

35 Capítulo 1. Introducción y objetivos

La sustitución del oxígeno de la base en la posición 2 del uracilo y timina por azufre ha demostrado tener poco efecto en la actividad, mientras que la sustitución de ambos oxígenos (posiciones 2 y 4) por azufre abolió completamente la actividad. De forma similar, la sustitución de la posición 2 por un grupo amino proporcionó sustratos inactivos para la enzima. Las modificaciones en la posición 6, como en el caso del 6-metiluracilo, 5,6-dimetiluracilo, 6-azauracilo y 6-azatimina, también produjeron inactividad enzimática.

Con respecto a las sustituciones en el esqueleto desoxirribosídico, se ha mostrado que la ribo-, la arabino-, y la xilofuranosiltimina no eran sustratos. Además fueron inactivos varios desoxinucleósidos sustituidos en la posición 5'. Esto sugirió que la sustitución sobre los carbonos en las posiciones 2',3' y 5' estaba involucrada en la unión de los sustratos al sitio activo de la enzima.

1.3.4.2.1- Antecedentes del uso de NPs en la síntesis de nucleósidos.

A continuación se describirán algunos ejemplos representativos de síntesis biocatalizadas de diversos nucleósidos tanto naturales como modificados utilizando NPs como biocatalizadores.

Donor glicosídico	Base	Nucleósido
Guanosina 2'-desoxiguanosina	1-desazapurina 3-desazapurina 1,3-didesazapurina	
Timidina 2'-desoxiguanosina	(E)-5-(2-Bromovinil) uracilo	
Adenosina	1,2,4-inazol-3-carboxamida	

R= desoxirribosa o ribosa

Figura 1.14. Síntesis enzimática de nucleósidos modificados en la base

36 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Mikhailopulo et al.⁷³ utilizaron células de *E. coli* como biocatalizador de las reacciones de transglucosidación, utilizando como donores glicosídicos guanosina o 2'-desoxiguanosina y como basesceptoras 1-, 3-desaza y 1,3-didesazapurinas, para la síntesis de diversos desazapurín nucleósidos (Figura 1.14). Por otro lado, Kalinichenko et al.⁷⁴ utilizaron una suspensión del mismo biocatalizador, generada por el agregado de glutaraldehído, para la síntesis del anti-herpético brivudina ((*E*)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina) utilizando 2'-desoxiguanosina o timidina como donador glicosídico y (*E*)-5-(2-bromovinil) uracilo como aceptor. (Figura 1.14). En un ejemplo de obtención de ribavirina, 424 cepas bacterianas fueron examinadas, siendo el *Bacillus megaterium* AJ 3284 el identificado como el mejor candidato para la transferencia del resto ribosa de la adenosina al resto 1,2,4-triazol-3-carboxamida⁷⁵ (Figura 1.14).

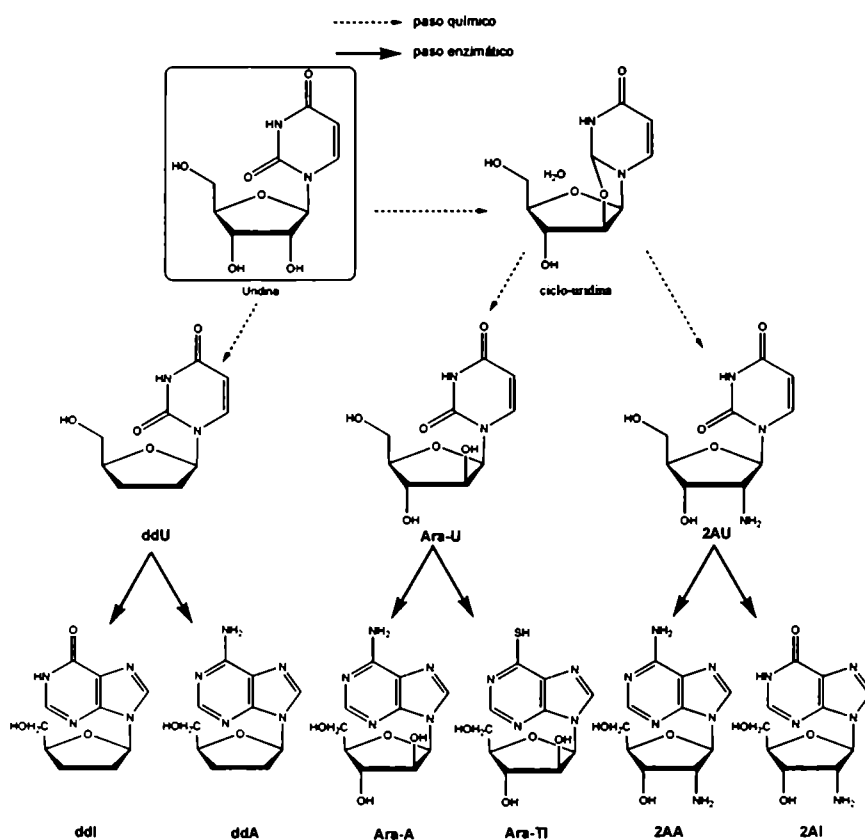


Figura 1.15. Síntesis enzimática de nucleósidos modificados en el azúcar.

⁷³ Zaitseva, G.; Kvasnyuk, E.; Vaaks, E.; Barai, V.; , Bokut, S.; Zinchenko, A.; Mikhailopulo, I.; *Nucleosides Nucleotides*, 1994, 13, 819

⁷⁴ Kalinichenko, E.; Barai, V.; Bokut, S.; Romanova, V.; Zinchenko, A.; Hermann, G.; Mikhailopulo, I.; *Biotechnol. Lett.*, 1989, 11, 621

La síntesis de nucleósidos modificados en el azúcar ha sido llevada a cabo por el uso de donores glicosídicos modificados⁷⁶. De esta forma, Utagawa et al.⁷⁷ han obtenido arabino-, 2'-amino-2'-desoxi- y 2',3'-didesoxinucleósidos con buenos rendimientos. La estrategia sintética empleada se resume en la **Figura 1.15**. Ésta consiste en la síntesis química de los donores glicosídicos modificados partiendo de uridina (2'-amino-2'-desoxiuridina (2AU), uridín-arabinósido (Ara-U) y 2',3'-didesoxiuridina (ddU), **Figura 1.15**), para luego generar el análogo nucleosídico por medio de reacciones de transglicosidación enzimática. De esta forma, se obtuvieron los siguientes nucleósidos modificados: 2',3'-dideoxiinosina (ddI), 2',3'-dideoxiadenosina (ddA), adenín-arabinósido (Ara-A), 6-mercaptoinosín arabinósido (Ara-TI), 2'-amino-2'-desoxiadenosina (2AA), 2'-amino-2'-desoxiinosina (2AI) (**Figura 1.15**). Otra estrategia utilizada en la síntesis de nucleósidos tanto naturales como modificados, especialmente en el resto glicosídico, consiste en la síntesis química de α -2-desoxirribósidos 1-fosfato y su conversión enzimática a desoxinucleósidos. La síntesis estereoselectiva del azúcar fosfato fue llevada a cabo por la aplicación de una transformación asimétrica inducida por cristalización (**Figura 1.16**). Araki et al.⁷⁸ han obtenido, utilizando esta metodología, los desoxinucleósidos naturales 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguanosina, 2'-desoxiinosina y timidina y el antiviral, 2',3'-dideoxi-3'-fluoroguanosina (**Figura 1.16**).

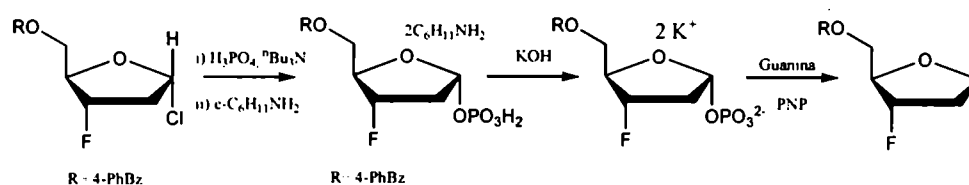


Figura 1.16. Estrategia quimio-enzimática empleada en la síntesis del antiviral 2',3'-dideoxi-3'-fluoroguanosina

Por último las NPs han sido utilizadas en la síntesis de nucleósidos modificados tanto en la base como en el azúcar mediante la utilización de un azúcar modificado como donador glicosídico y bases modificadas como aceptores. Así, Chae et al.⁷⁹ sintetizaron 2',5'-dideoxi-6-tioguanosina y

⁷⁵ Shirae, H.; Yokozeki, K.; and Kubota, K.; *Agric. Biol. Chem.*, **1991**, *55*, 605

⁷⁶ Ver por ejemplo a) Morisawa, H.; Utagawa, T.; Miyoshi, T.; Yoshinaga, F.; Yamazaki, A.; Mitsugi, K. *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 479, b) Utagawa, T.; Morisawa, H.; Yoshinaga, F.; Yamazaki, A.; Mitsugi, K.; Hirose, Y.; *Agric. Biol. Chem.*, **1985**, *49*, 1053

⁷⁷ Utagawa, T.; *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, **1999**, *6*, 215

⁷⁸ Komatsu, H.; Awano, H.; Ishibashi, H.; Oikawa, T.; Ikeda, I.; Araki, T.; *Nucleic Acids Sym.p Ser.*, **2003**, *3*, 101

⁷⁹ Burns, C.; Koszalka, G.; Krenitsky, T.; *Chem. Abstr.*, **1994**, *120*, 29465

38 Capítulo 1. Introducción y objetivos

5'-desoxi-6-tioguanosina utilizando 2',5'-didesoxitimidina y 5'-desoxiadenosina como donores glicosídicos y 6-tioguanina como base aceptora, entre otros nucleósidos doblemente modificados.

Por otra parte, nuestro grupo ha utilizado células enteras para la síntesis enzimática de diversos nucleósidos modificados. De esta manera se han obtenido con altos rendimientos diversos 2,6-diaminopurín ribonucleósidos, -2'-desoxiribonucleósidos, -2',3'-didesoxiribonucleósidos y -arabinonucleósidos partiendo de uridina, timidina, 2',3'-didesoxiuridina o 1-β-arabinofuranosil uracilo respectivamente, y la base 2,6-diaminopurina, utilizando diversos microorganismos como fuentes de NPs⁸⁰. Asimismo, se ha preparado el nucleósido 9-β-D-arabinofuranosil guanina mediante el uso combinado de dos células enteras como biocatalizador⁸¹. En este caso, se llevo a cabo la síntesis del 2,6-diaminopurín arabinonucleósido mediante las citadas reacciones de transglicosidación, para luego llevar a cabo una desaminación enzimática utilizando *Arthrobacter oxydans* como biocatalizador. Por último se han obtenido benzimidazol ribo- y 2'-desoxinucleósidos partiendo de los nucleósidos pirimidínicos, uridina y timidina y benzimidazol⁸², entre otros ejemplos de síntesis de nucleósidos llevados a cabo por nuestro grupo.

1.3.4.3- Fosfopentomutasa (PPM).

La PPM cataliza la transferencia estereoselectiva de un grupo fosfato entre los hidroxilos de las posiciones 5 y 1 de la ribosa y la desoxirribosa y análogos, tanto en microorganismos como en células de mamíferos. En 1951 Klenow y Abrams⁸³ reportaron la conversión de R-1-P a R-5-P por una enzima de hígado de rata. Al mismo tiempo Manson y Lampen⁸⁴ demostraron una reacción análoga que involucraba desoxirribosfosfatos en timo de ternera. La actividad fosfopentomutasa en *E. coli* fue demostrada en 1952⁸⁵, pero fue Hammer-Jespersen⁸⁶ quien purificó y evaluó las diversas propiedades de ésta PPM. En ese trabajo se determinó que la relación de la actividad de la enzima cuando se utilizaba R-1-P o desoxirribosa 1-fosfato (dR-1-P) como sustratos era aproximadamente de 1:2, no siendo la glucosa-1-fosfato sustrato. Además, se

⁸⁰ Medici, R.; Lewkowicz, E.; Iribarren, A.; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2006**, 39, 40

⁸¹ Medici, R.; Lewkowicz, E.; Iribarren, A.; *Bioorganic And Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, 19, 4210

⁸² Bentacor, L.; Trelles, J.; Nobile, M.; Lewkowicz, E.; Iribarren, A.; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**, 29, 3

⁸³ Abrams, A.; Klenow, H.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1951**, 34, 28

⁸⁴ Manson, L.; Lampen, J.; *J. Biol. Chem.*, **1951**, 191, 95

⁸⁵ Hoffmann, C.; Lampen, J.; *J. Biol. Chem.*, **1952**, 198, 885

⁸⁶ Hammer-jespersen, K.; Petersen, A.; *Eur. J. Biochem.*, **1970**, 17, 397

39 Capítulo 1. Introducción y objetivos

demostró que la PPM presenta un requerimiento absoluto de metales divalentes para su actividad. El Co^{+2} y el Mn^{+2} tuvieron el mismo efecto como activadores siendo la actividad siete veces menor en presencia de Ni^{2+} . Otros metales divalentes exhibieron un efecto inhibitorio presentando entre un 95-98% de inhibición en presencia de Cu^{+2} , Cd^{+2} y Zn^{+2} y entre un 50-70 % en presencia de Ca^{+2} y Mg^{+2} . El sulfato y fosfato resultaron, asimismo, ser inhibidores observándose un 85 % y un 95 % de inhibición respectivamente, con concentraciones 50 mM de estas sales. Otros tipos de cofactores evaluados fueron los glicósidos difosfato. En este sentido, se compararon los efectos activadores de la ribosa-1,5-difosfato, la desoxirribosa-1,5-difosfato y la glucosa-1,6-difosfato. Los dos primeros estimularon la actividad diez veces mientras que el último lo hizo sólo tres veces. Finalmente estos autores estudiaron la curva de actividad en función del pH encontrando el pH óptimo alrededor de ocho.

Estudios posteriores demostraron que la PPM era una metaloproteína monomérica de 407 aminoácidos ($M_r \sim 45$ kDa), con dos cationes metálicos divalentes por unidad.

Desafortunadamente, la estructura de la PPM de *E. coli* no ha sido resuelta, por lo que no se cuenta con un modelo estructural de la misma. Sí fue realizado un análisis de la conservación aminoacídica en las secuencias de diversas familias de enzimas⁸⁷. En ese trabajo se encontró que las secuencias de las enzimas pertenecientes a la familia de las PPMs muestran similitudes significativas con secuencias de fosfatasas alcalinas y con otras familias de enzimas, tales como las sulfatasas, y diversas transferasas e hidrolasas, que actúan sobre sustratos similares (carbohidratos fosforilados). Estas similitudes incluyen una elevada conservación de los residuos del sitio de unión a metal de sus centros activos, y mecanismos catalíticos similares. Estos hallazgos sugirieron a los autores que estas familias de proteínas pertenecían a una superfamilia de enzimas, denominada superfamilia de la fosfatasa alcalina.

1.3.4.3.1-Antecedentes del uso de la PPM en la síntesis de nucleósidos.

La PPM fue originalmente sobreexpresada por Valentin-Hansen et al.⁸⁸ pero fue Wong⁸⁹ el primero en comparar las actividades relativas de conversión de D-pentosas 5-fosfatos a α -pentosas 1-fosfato usando un ensayo enzimático acoplado la PPM sobreexpresada con NPs. En ese trabajo, se estableció que la PPM de *E.coli* aceptaba como sustratos desoxirribosa 5-fosfato

⁸⁷ Galperin, M.; Bairoch, A.; Koonin, E.; *Protein Science*, 1998, 7, 1829

⁸⁸ Valentin-Hansen, P.; Hammer, K.; Lø Larsen, J.; Svendsen, I.; *Nucleic acids Res.*, 1984, 12, 5211

40 Capítulo 1. Introducción y objetivos

(dR-5-P), R-5-P y arabinosa 5-fosfato (A-5-P) pero no 2,3-didesoxirribosa 5-fosfato. Lamentablemente, los autores no informaron los rendimientos en las reacciones de síntesis de nucleósidos ni sus actividades absolutas. Para el caso particular de desoxinucleósidos ha sido reportado el uso sintético de la PPM de *E. coli* por Ouerkerk et al⁹⁰, quienes llevaron adelante la preparación de timidina y 2'-desoxiuridina marcada con ¹⁵N y ¹³C. En esa publicación se reporta en primer lugar, la síntesis por métodos químicos clásicos del sustrato de la PPM marcado, la dR-5-P. Este sustrato es agregado entonces al sistema enzimático acoplado (PPM + TP), obteniéndose los nucleósidos marcados con elevados rendimientos. En este mismo sentido, el grupo de Shimizu⁹¹ desarrolló una síntesis microbiana "one-pot" de 2'-desoxirribonucleósidos mediante el acoplamiento de tres enzimas: la enzima 2-desoxirribosa 5-fosfato aldolasa (DERA), que produce reversiblemente desoxirribosa 5-fosfato á partir de acetaldehído y gliceraldehído 3-fosfato, la PPM de *E. coli* y la enzima PNP. La estrategia empleada se muestra en la figura 1.17.

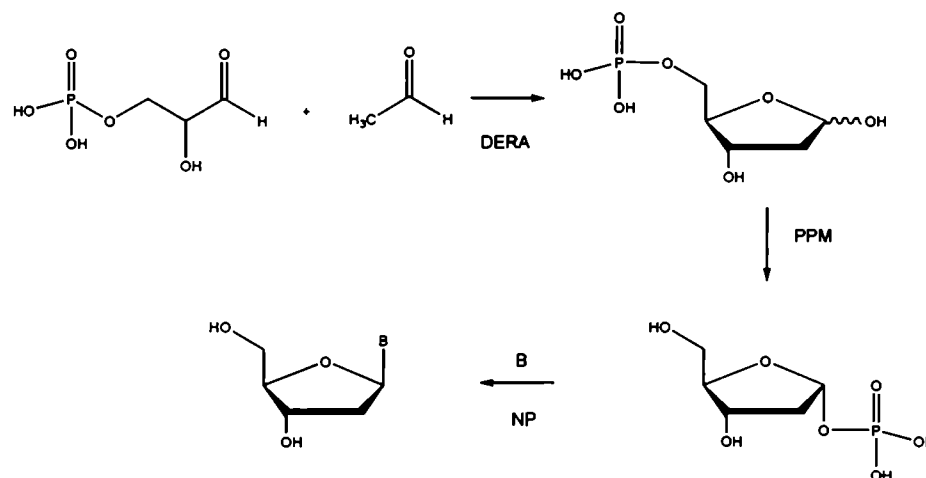


Figura 1.17. Preparación enzimática de desoxinucleósidos

Se han sobreexpresado PPMs de otras fuentes microbianas, como por ejemplo la PPM de *Bacillus stearothermophilus*⁹². Esta enzima se utilizó para la síntesis de adenosina y análogos acoplada con la PNP, utilizando como sustratos R-5-P; dR-5-P, A-5-P y 2,3-didesoxirribosa 5-fosfato. Los cuatro azúcares fosfato fueron activos, observándose actividades relativas porcentuales de 100, 156, 9 y 12 respectivamente. Otra PPM aislada fue la del microorganismo

⁸⁹ Barbas III, C.; Wong, C.; *Bioorg. Chem.*, **1991**, 19, 261

⁹⁰ Ouerkerk, N.; Steenweng, M.; Raap, J.; *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 1480

⁹¹ Ogawa, J.; Saito, K.; Sakai, T.; Horinouchi, N.; Kawano, T.; Matsumoto, S.; Sasaki, M.; Mikami, Y.; Shimizu, S.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2003**, 67, 933

⁹² Hamamoto, T.; Noguchi, T.; Midorikawa, Y.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1998**, 62, 1103

41 Capítulo 1. Introducción y objetivos

hipertermofílico *Thermococcus kadkaraensis*. Los autores sólo ensayaron la actividad con ribo y desoxirribosfosfatos, pero la enzima demostró ser activa a una temperatura de 90 °C⁹³.

1.4- Introducción a la sobreexpresión de proteínas

La expresión de proteínas recombinantes, desde el punto de vista biotecnológico, plantea como principal objetivo la obtención de un alto contenido de la proteína de interés por unidad de biomasa⁹⁴. En forma sintética, el proceso de sobreexpresión de proteínas recombinantes consta de los siguientes pasos (Figura 1.18): en primer lugar se debe insertar el gen que codifica para la proteína de interés en una construcción génica adecuada (vector de expresión). Ésta es transfectada en una célula huésped competente. Luego, una vez alcanzada una biomasa apreciable se induce la transcripción del gen en cuestión. Por último, se purifica la proteína recombinante.

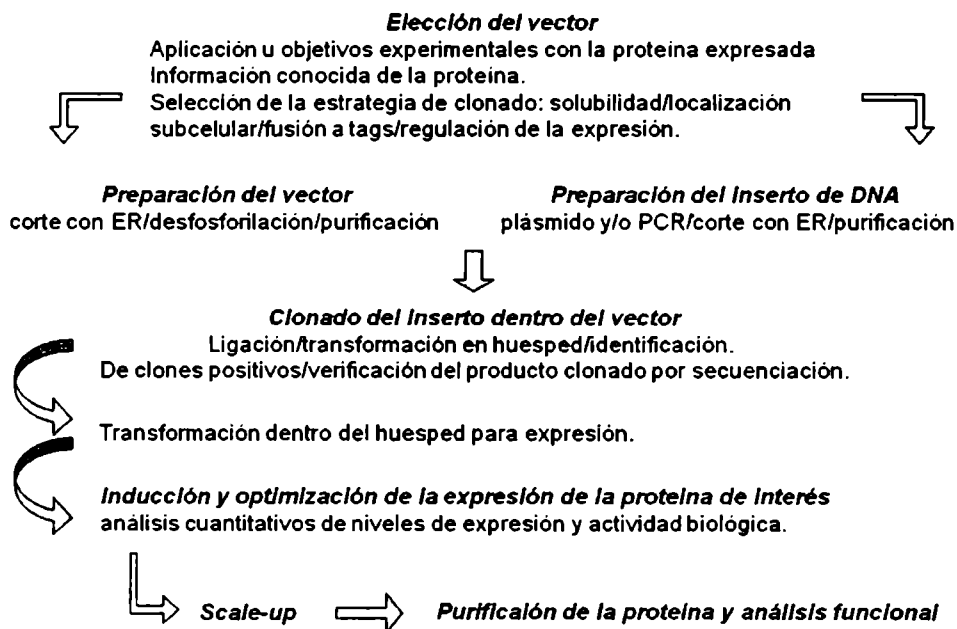


Figura 1.18. Diseño de una estrategia para la expresión de proteínas

⁹³ Rashid, N.; Imanaka, H.; Fukui, T.; Atomi, H.; Imanaka, T.; *J. Bacteriol.*, 2004, 186, 4185

1.4.1. Selección del tipo de construcción génica y célula huésped

El rendimiento de la proteína recombinante respecto a la biomasa está determinado principalmente por el tipo de construcción genética (vector de expresión) y por la capacidad biosintética de la célula huésped, por lo que hallar el sistema de expresión de proteínas que permita obtener grandes cantidades de la proteína recombinante, es básico, y de vital importancia para cualquier estudio cuyo objetivo esté orientado hacia la producción biotecnológica. En este sentido, se utiliza la ingeniería genética para lograr la correcta expresión a altos niveles de un gen clonado en un microorganismo huésped. Sin embargo, la clonación directa (sin manipulación adicional) de un gen en un vector no suele asegurar la correcta expresión del mismo, por esta razón se deben seleccionar vectores especializados, y a menudo, incluir modificaciones de interés con el objeto de que se pueda correctamente transcribir y traducirse en el microorganismo huésped. Dentro de los aspectos que deben tenerse en cuenta con este fin, se pueden citar la localización celular de la proteína a expresar (se pueden añadir señales de procesamiento post-transduccional adecuadas en la construcción genética para dirigir a la proteína), la estabilidad de la proteína en la célula huésped y el número de copias del gen clonado, entre otros. En el proceso de selección del sistema de expresión adecuado para la proteína de interés, se deben analizar específicamente estos parámetros.

Concerniente a la selección de células huésped, se han utilizado de diversos orígenes, tanto procariotas como eucariotas, siendo las primeras las más estudiadas. En este sentido, uno de los microorganismos más utilizados es la bacteria *Escherichia coli*. Su uso radica en la gran disponibilidad de herramientas de genética molecular, el gran número de cepas y mutantes, el extenso conocimiento sobre su fisiología, vectores de expresión, estabilidad y plegamiento de proteínas, estabilidad genética de las construcciones y por último, los efectos de la producción de proteínas recombinantes sobre la célula.

Las proteínas recombinantes expresadas pueden ser tanto heterólogas (de un origen diverso al huésped) u homólogas (del mismo origen). La producción de proteínas heterólogas en *E. coli* es un proceso dinámico complejo que involucra muchos retos. Para el caso de proteínas homólogas, el panorama se presenta con menores dificultades. En este trabajo se ha sobreexpresado una proteína homóloga, la enzima fosfopentomutasa de *E. coli*. Sin embargo, la

⁹⁴ Kramer, W.; Elmecker G.; Weik, R.; Mattanovich, D.; Bayer, K, Recombinant DNA Biotechnology: The integration of Biological and Engineering sciences, 1996, 323

expresión de proteínas homólogas puede conllevar a ciertos problemas como ser los de estrés metabólico. Éstos se deben a la expresión en grandes cantidades de una proteína que se traduce en un incremento de la actividad de proteasas, plegamientos inadecuados de proteínas y formación de cuerpos de inclusión, todos los cuales pueden afectar la concentración final de la proteína recombinante y el crecimiento celular.

A continuación se resumen los elementos genéticos que debe poseer un vector de expresión en *E. Coli*:

- Un promotor eficiente, para producir altos niveles de ARNm
- Cercano al promotor, una región que al transcribirse suministre el sitio de unión al ribosoma: la denominada secuencia de Shine-Delgarno.
- Luego del gen a clonar, una secuencia que funcione como terminador de la transcripción.
- Si se requiere, una proteína de fusión (ésta puede facilitar el proceso de purificación, protegerla ante la proteólisis o incrementar la solubilidad y la estabilidad de la proteína).

La dirección http://www.embl-hamburg.de/~geerlof/webPP/vectordb/bact_vectors/ corresponde a una base de datos de los diferentes vectores de expresión comerciales disponibles actualmente para *E. coli*. Cada uno de estos sistemas tiene características particulares, tanto en el diseño del vector, como del hospedador. El sistema utilizado en esta tesis se denomina pRSET-A. (Figura 1.19)

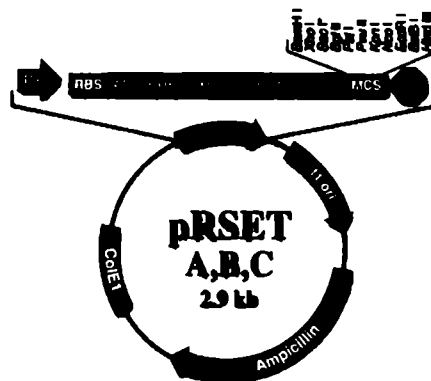


Figura 1.19. Mapa del vector pRSET

El vector pRSET.A es útil para la expresión de altos niveles de proteínas procariontas controlada por el promotor fuerte del bacteriófago T7. La expresión es inducida por la producción de la ARN polimerasa en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Estas células pueden también producir la lisozima T7 con el objeto de reducir la expresión basal de los genes de interés. Este vector posee una

Capítulo 1. Introducción y objetivos

secuencia que codifica para una cola de seis histidinas en la posición *N*-terminal. Esta secuencia tiene como objeto facilitar la posterior purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad. Asimismo, posee un sitio de hidrólisis de la proteasa enteroquinasa, con el objeto de remover, en caso que fuera necesario, las histidinas añadidas a la proteína de interés.

1.5- Inmovilización de Enzimas

1.5.1- Generalidades.

A pesar de las claras ventajas del empleo de enzimas como catalizadores en procesos industriales, existen un número de problemas prácticos en el uso de las mismas. En primer lugar, la mayoría de los biocatalizadores no son estables en las condiciones de trabajo, lo cual resulta en una vida media operacional de la enzima más corta. Asimismo, a diferencia de los catalizadores químicos convencionales de fase heterogénea, la mayor parte de las enzimas actúan en fase homogénea, por lo que son muy difícilmente recuperables en su forma activa a partir de las mezclas de reacción para un posterior reuso. Es entonces que la inmovilización enzimática, al transformar a las enzimas en un catalizador heterogéneo, es una metodología muy efectiva para superar estas limitaciones.

Se puede definir entonces la inmovilización enzimática, como un proceso en el que se confina o localiza al biocatalizador en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente⁹⁵. Posteriormente esta definición se ha ampliado al de un proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte, tal que se pueda reutilizar.⁹⁶

Se pueden destacar tres aspectos interesantes incluidos en la definición:

“Confinados o localizados”: para cumplir con esta condición es necesario formar una fase sólida dispersa, macroscópica, de alta densidad y catalíticamente activa, dentro de, o en contacto con, un medio reactivo líquido libre de biocatalizador. Las características de la fase sólida son tales que

⁹⁵ 1er Enzyme Engineering Conference, Henniker, New Hampshire, USA, 1971.

⁹⁶ Taylor, R. *Protein Immobilization: fundamentals and applications*, Marcel Dekker, New York, 1991

45 Capítulo 1. Introducción y objetivos

el transporte de reactivos hacia y desde el biocatalizador está gobernado por difusión exclusivamente.

“Retención de la actividad catalítica”: los tratamientos a los que son sometidas las enzimas libres que serán inmovilizadas afectan en cierto grado su actividad. Si bien es deseable, no es necesario que se retenga el 100% de la actividad del biocatalizador libre, pero, para mantener la viabilidad del proceso, en general es deseable no tener valores de actividad inferiores al 25% de la actividad de la enzima libre. La inmovilización, entonces, debe tratar de ser realizada en condiciones tales que la pérdida de actividad sea reducida.

“Uso repetido y continuo”: surge inmediatamente que la gran ventaja del uso de biocatalizadores inmovilizados; se relaciona con la fácil separación del catalizador del medio de reacción sin pérdida de actividad, y por consecuencia directa, con su reutilización.

Como se ha citado previamente el uso de los biocatalizadores inmovilizados ha introducido diversas ventajas con respecto a los mismos en solución o libres. Éstas se pueden resumir:

- 1.- Se produce un gran aumento de la estabilidad de la enzima inmovilizada, por lo que en comparación con las enzimas libres en solución son más robustas y más resistentes a cambios bruscos en el entorno
- 2.- Se aumenta de gran manera la productividad enzimática por la capacidad de reutilización (sistema enzimático heterogéneo)
- 3.- Se aumenta la facilidad de recuperación y purificación de los productos
- 4.- Se puede elegir entre una gran variedad de diseños de procesos (configuración de reactores)

Sin embargo el confinamiento de los biocatalizadores presenta ciertos inconvenientes⁹⁷, entre los cuales se pueden mencionar:

- 1.- Generalmente, se observa una disminución de la actividad del biocatalizador durante el proceso de inmovilización. Esto se origina posiblemente por la alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo

46 Capítulo 1. Introducción y objetivos

2.- La gran heterogeneidad del sistema biocatalizador-soporte, donde pueden existir distintas fracciones de un mismo biocatalizador inmovilizado con una notable diferencia de carga enzimática

3- El aumento de los problemas difusionales, estos disminuyen la actividad aparente del biocatalizador inmovilizado principalmente por limitaciones de transferencia de masa

1.5.2- Métodos de inmovilización

Para obtener biocatalizadores inmovilizados que retengan actividad y sean estables es necesario aplicar un método de inmovilización adecuado, que dependerá del tipo de actividad catalítica de interés. Existen una variedad de métodos por los cuales se puede localizar o confinar un biocatalizador, desde la unión covalente de los mismos a un soporte o *carrier*, hasta su atrapamiento físico, sin embargo pueden ser clasificados en términos generales de la siguiente manera⁹⁸ (Figura 1.20):

- Unión covalente a matrices derivatizadas, insolubles en agua
- Entrecruzamiento intermolecular de moléculas de enzima, utilizando agentes polifuncionales
- Adsorción de los biocatalizadores sobre matrices insolubles en agua
- Atrapamiento de los biocatalizadores dentro de polímeros insolubles en agua
- Encapsulación dentro de membranas semi-permeables

⁹⁷ Arroyo, M.; *Ars. Pharmaceutica*, 1998, 39, 23

⁹⁸ P.W. Carr and L.D. Bowers, "*Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry. Fundamentals and Applications*", Wiley, New York, 1980.

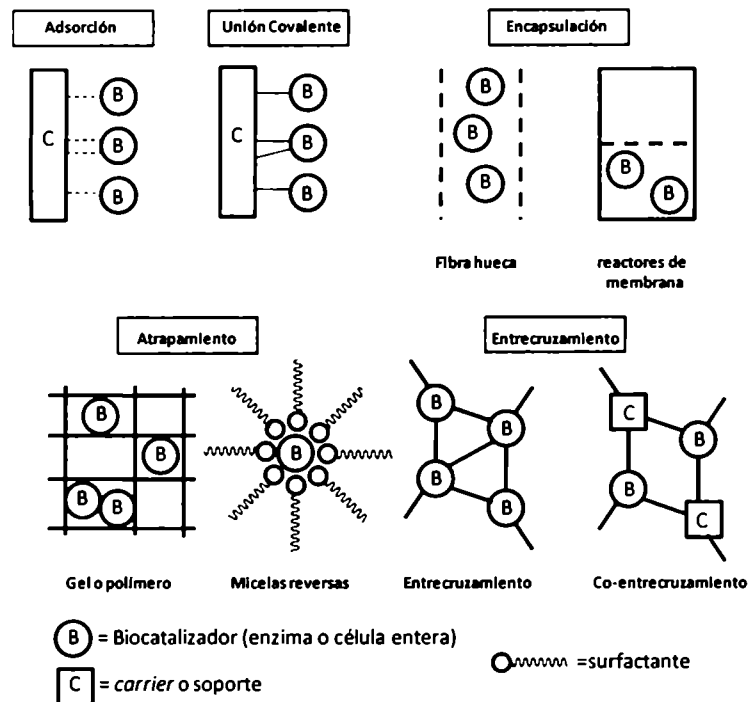


Figura 1.20. Tipos de inmovilización.

1.5.3- Selección del método de inmovilización

Los requerimientos necesarios para la construcción de un eficiente complejo bioinmovilizado incluyen:

- Alta densidad de biomoléculas inmovilizados
- Alta actividad
- Prolongada estabilidad bajo condiciones potencialmente adversas
- Buena accesibilidad de los analitos
- Tiempos de respuesta rápidos
- Resistencia a la lixiviación y/o desorción

A pesar de la elevada cantidad de información sobre las técnicas de inmovilización enzimática, el desarrollo de un biocatalizador inmovilizado robusto que satisfaga los requerimientos de los procesos biocatalíticos modernos, todavía depende de experimentos laboriosos de prueba y error. No existe un método universal y válido para todos los sistemas. Se

48 Capítulo 1. Introducción y objetivos

requiere una solución específica para cada aplicación individual. No obstante la información disponible en la actualidad permite hacer algunas generalizaciones sobre los diferentes métodos de inmovilización (Tabla 1.2)⁹⁹ y así poder racionalizar en alguna medida la selección de la metodología más adecuada.

	Encapsulación	Atrapamiento	Entrecruzamiento	Adsorción	Unión covalente
Preparación	Intermedia	Sencilla	Intermedia	Sencilla	Difícil
Fuerza de unión	Débil	Media	Débil-media	Débil-media	Fuerte
regeneración del soporte	Posible	Imposible	Imposible	Posible	Difícil
actividad enzimática	Media-alta	Baja	Baja	Media	Alta
Costo del proceso	Medio-alto	Medio	Medio	Bajo	Alto
Estabilidad	Media	Alta	Alta	Baja	Alta
Validez	General	General	Limitada	General	Limitada
Resistencia microbiana	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

Tabla 1.2. Comparación de los diferentes métodos de inmovilización

En general, los métodos de difícil preparación y de mayor costo proporcionan biocatalizadores más estables y duraderos, mientras que los métodos más sencillos como el atrapamiento o la adsorción, donde la interacción con el biocatalizador es débil, originan derivados inmovilizados que presentan mayor pérdida de actividad.

1.5.4- Atrapamiento de enzimas por tecnología sol-gel

1.5.4.1- Definición y características del proceso sol-gel.

El sol-gel es una ruta química que inicia con la síntesis de una suspensión coloidal de partículas sólidas o cúmulos en un líquido (sol), formada a partir de la hidrólisis de un precursor

⁹⁹ Working party of Immobilized Biocatalysts. *Enzyme Microb. Technol.*, 1983, 5, 304

49 Capítulo 1. Introducción y objetivos

organometálico; y la hidrólisis y condensación de este sol para formar un gel, o sea, un sólido consistente de al menos dos fases, donde una fase sólida forma una red rígida e interconectada con poros que atrapa e inmoviliza una fase líquida¹⁰⁰.

Una característica muy importante que presenta este proceso es que se puede trabajar a temperaturas muy bajas obteniendo materiales puros con un alto grado de homogeneidad.

El proceso sol-gel se esquematiza en la **figura 1.21**.

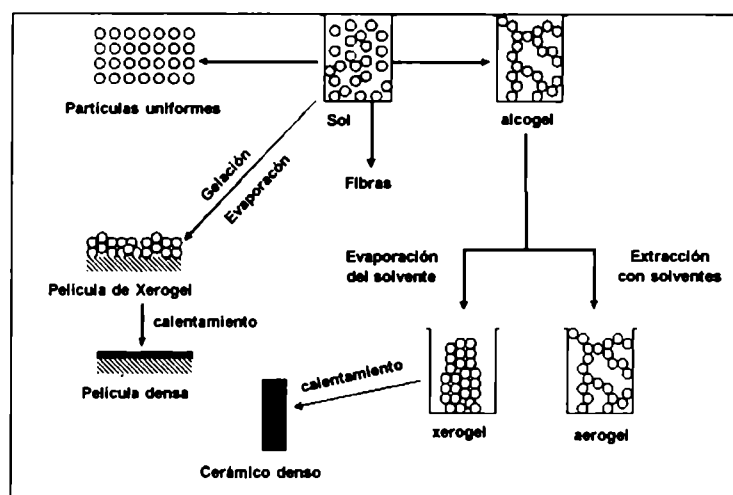
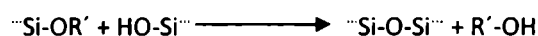
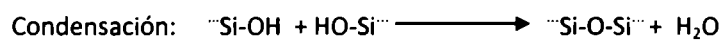
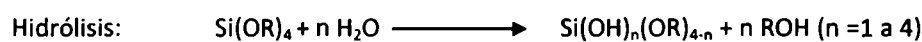


Figura 1.21. Esquema del proceso sol-gel

Los desencadenantes de la transición sol-gel son las reacciones de hidrólisis y condensación de alcóxidos metálicos que ocurren simultáneamente. En general, un aumento del pH, inicia los eventos de condensación y separación de fase. Las reacciones involucradas son:



Una vez formado el hidrogel, éste es envejecido por un período de tiempo para permitir la terminación de las reacciones de condensación y la maduración del entramado poroso. Este entrecruzamiento produce un encogimiento del hidrogel por la contracción del entramado poroso y la consecuente expulsión de agua por sinéresis. Finalmente este hidrogel es secado, consolidando la estructura con colapso de poros y mayor encogimiento (xerogel). Se requiere en

¹⁰⁰ Brinker, J.; Scherer, G.; *Sol Gel Science*, Academic Press INC., 1990. ISBN 0-12-134970-5

50 Capítulo 1. Introducción y objetivos

esta etapa un secado controlado (ej: vía liofilización) para evitar el colapso extremo de la estructura con la consiguiente pérdida de porosidad y viabilidad de la biomolécula. El agregado de aditivos para el control del secado o el uso de precursores del tipo gliceroxisilanos puede sustancialmente reducir el colapso de poros y acelerar el proceso de secado, obteniéndose altos niveles de actividad de la biomolécula. Es importante señalar que la rehidratación de los xerogeles resulta en una considerable expansión del entramado poroso.

1.5.4.2- Atrapamiento de biomoléculas vía el proceso sol-gel de sílica

El procedimiento de atrapamiento de biomoléculas debe ser conducidos a pHs, condiciones redox y temperaturas biocompatibles, así como se deben minimizar el uso de solventes y especies orgánicas reactivas. Por lo que el atrapamiento de biomoléculas vía procesos sol-gel se ha basado en la química del SiO₂, debido al carácter mayoritariamente inerte de esta matriz. Los precursores más utilizados han sido el TEOS (tetraetilortosilicato) y TMOS (tetrametilortosilicato).

Esta tecnología ofrece algunas ventajas únicas para la inmovilización de especies biológicas

- La polimerización sol-gel ofrece la única ruta conocida hasta hoy, para incorporar biomoléculas lábiles en materiales cerámicos fisicoquímicamente robustos para formar verdaderos nanocompuestos.
- La flexibilidad intrínseca de los polímeros sol-gel basados en la química de sílice puede ser aprovechada para efectuar el atrapamiento en un rango diverso de materiales inorgánicos u orgánicos-inorgánicos híbridos, pudiéndose incluir aditivos poliméricos así como modificadores redox.
- Pueden ser materiales ópticamente transparentes, haciéndoles ideales para el desarrollo de sensores. La adición de modificadores redox permite asimismo la construcción de dispositivos electroquímicos.
- Se pueden utilizar métodos convencionales de fabricación para formar bioencapsulados como monolitos, nano-, micro- y macropartículas, fibras, y diversos films, con una distribución y tamaño de poro controlable.

Aún no se conoce con exactitud el mecanismo de atrapamiento y retención de biomoléculas. Las investigaciones sugieren que el bioatrapamiento deriva de la internalización física dentro de

51 Capítulo 1. Introducción y objetivos

las partículas del sol-gel y/o interacciones fuertes entre la proteína y las superficies del gel, suficientes para impedir el lixiviado, permitiendo, sin embargo, la retención de la movilidad global de la biomolécula.

Un problema que puede aparecer en ciertos casos, es la disrupción de la estructura del sitio activo provocada por interacciones electrostáticas con la matriz aniónica de sílica, lo que suele producir una disminución de la actividad biológica de la biomolécula.

Existen diversos tipos de matrices de inmovilización vía la tecnología sol-gel, entre los cuales se incluyen sol-gel inorgánicos, sol-gel de silicatos modificados orgánicamente, IPN (red polimérica interpenetrada), sol-gel reforzados, sol-geles basados en templados, etc. Se discutirá en este capítulo el último, ya que fue el utilizado en este trabajo.

1.5.4.3- Sol-gel basados en un templado (*direct-template-assembly*)

Los sol-geles pueden ser moldeados con estructuras directoras y agentes formadores de poro, incluyendo polioles, hidroxiácidos, PEG, surfactantes y co-polímeros. Estos compuestos forman microemulsiones, fases cristalinas vesiculares o líquidas, macroemulsiones, espumas o agregados, y, de esta forma dirigen la formación del sol-gel o la separación de fases durante la gelificación modificando la estructura del sol-gel. Es así posible obtener entonces los materiales ordenados, macro- o meso- porosos, por remoción de los templados luego del envejecimiento del gel.

En este trabajo se ha utilizado hielo como templado¹⁰¹, utilizando un proceso de tratamiento denominado "*Ice Segregation Induced Self Assembly*" (ISISA). Éste es un templado económico, no requiere procesos extremos para su remoción sino procesos biocompatibles y poco contaminantes. El procesamiento por la metodología de ISISA involucra la exposición de un gel acuoso a temperaturas del orden del nitrógeno líquido. La rápida formación de hielo (en forma hexagonal) causa que cada soluto originalmente disperso en el gel acuoso sea segregado de la fase acuosa, dando lugar a ensamblados jerárquicos caracterizados por "vallas" de materia encerradas en áreas vacías, siendo estas áreas las que ocupaba el hielo previamente a ser removido por diversas metodologías, como ser la liofilización¹⁰².

¹⁰¹ Nishihara, H.; Mukai, S.; Fujii, Y.; Tago, T.; Masuda, T.; Tamon, H.; *J. Mater. Chem.*, **2006**, *16*, 3231

¹⁰² Gutierrez, M.; Jobágyi, M.; Rapun, N.; Ferrer, M.; Del Monte, F.; *Adv. Mater.*, **2006**, *18*, 1137

52 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Con el objeto de preservar la actividad enzimática y mejorar las propiedades mecánicas del biocatalizador inmovilizado se puede:

- Añadir aditivos (por ejemplo polímeros): éstos pueden condensar con los grupos silanoles resultando en la formación de enlaces Si-O-polímero, favoreciendo la formación de una red polimérica interpenetrada que puede aumentar la resistencia del material, haciéndolo menos quebradizo. Asimismo, puede preservar la actividad enzimática impidiendo la desnaturalización de la enzima por su interacción con los grupos silanoles de la superficie. También puede actuar como crioprotector⁹⁴
- Utilizar precursores modificados biocompatibles: éstos al ser hidrolizados liberan grupos biocompatibles disminuyendo la desnaturalización proteica (en el caso de utilizar TEOS como precursor, se libera alcohol etílico). Asimismo, pueden ser disueltos directamente en agua y condensan a pH neutros, eliminando la necesidad de alteraciones abruptas en el pH durante el procesamiento del gel¹⁰³. Estos materiales de partida, asimismo, generan materiales con menor grado de encogimiento, menor diámetro de poro y propiedades mecánicas mejores que los materiales basados en TEOS¹⁰⁴.

1.5.4.4- Antecedentes del atrapamiento de enzimas utilizando sistemas sol-gel de sílica

El proceso sol-gel, como una ruta para la formación de compuestos vítreos inorgánicos ha sido ampliamente conocido por más de un siglo, sin embargo el primer reporte en el cual se demostraba el uso de materiales derivados de silicatos para el atrapamiento de enzimas recién se publicó en los años 50, cuando Dickey¹⁰⁵ mostró que diversas enzimas (tales como la ureasa, catalasa, adenilato desaminasa y citocromo C) podían ser atrapadas con parcial retención de su actividad biológica, en matrices derivadas de estos materiales. A pesar de los trabajos citados previamente, el avance crucial en la bioencapsulación o atrapamiento vía sol-gel, fue dado por el esfuerzo pionero de Avnir y colaboradores¹⁰⁶, quienes a principios de la década del 90 publicaron un reporte describiendo el atrapamiento de proteínas dentro de derivados de silicatos formados por el uso de alcoxisilanos simples (TMOS y TEOS) usando la metodología sol-gel. Los trabajos iniciales en esta área fueron restringidos al atrapamiento de hidrolasas modelos tales como la

¹⁰³ Chery, H.; Tameki, R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 10063

¹⁰⁴ Brandhuber, D.; Torma, V.; Raab, C.; Peterlik, H.; Kulak, A.; Husing, N. *Chem. Mat.*, **2005**, 17, 4262

¹⁰⁵ Dickey, F.; *J. Phys. Chem.*, **1955**, 58, 695

¹⁰⁶ Braun, S.; Rappoport, S.; Zusman, R.; Avnir, D.; Ottolenghi, M.; *Mater. Letter*, **1990**, 10, 1

53 Capítulo 1. Introducción y objetivos

tripsina y la fosfatasa ácida, pero poco fue investigado acerca de las aplicaciones sintéticas. Retz y colaboradores¹⁰⁷ fueron los primeros que establecieron las utilidades prácticas de los biocatalizadores basados en la tecnología sol-gel con sus estudios acerca del atrapamiento de lipasas en compuestos basados en silanos modificados orgánicamente (ormosil). Estos biocatalizadores han sido utilizados para catalizar reacciones de hidrólisis regio-, químio- y enantioselectiva, reacciones de esterificación y transesterificación de ácidos carboxílicos, alcoholes y ésteres y la acetilación de aminas en medio acuoso y orgánico. Además de hidrolasas se han inmovilizado en este tipo de materiales proteasas, glicosidasas, fosfatasa alcalinas, fosfolipasas y péptidos, glicosidos, oligosacáridos y lípidos bioactivos, entre otros¹⁰⁸.

La flexibilidad y el poder del atrapamiento sol-gel se demuestra fehacientemente con su aplicación a la preparación de biocatalizadores multienzimáticos. Por lo que se ha demostrado que la co-inmovilización o co-atrapamiento de enzimas que catalizan reacciones consecutivas puede llevar a un aumento de la eficiencia catalítica y productiva, presumiblemente debido a la proximidad de los centros catalíticos, resultando en una eficiente transferencia de los intermediarios de la reacción entre las enzimas, aumentando efectivamente su concentración local¹⁰⁹.

Se han reportado trabajos que se basan en la química del sol-gel para el atrapamiento de enzimas, utilizando polímeros como aditivos, utilizando el proceso de ISISA para la obtención de materiales altamente organizados¹¹⁰. Un ejemplo es la inmovilización de una lipasa (lipasa de hígado de cerdo, PLE) utilizando PVA como aditivo.

1.6- Modelización de proteínas

La forma ideal de obtener información estructural para una proteína dada es determinar la estructura por cristalografía de rayos X o espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Sin embargo, existen una serie de problemas:

¹⁰⁷ Ver por ejemplo: a) Reetz, M.; *Adv. Mater.*, **1997**, *9*, 943, b) Reetz, M.; Wenkel, R.; Avnic, D.; *Síntesis*, **2000**, *5*, 781, c) Reetz, M.; Zanta, a.; Vijayakrishnan, K.; Schimassek, K.; *J. Mol. Cat. A*, **1998**, *134*, 251

¹⁰⁸ Ver por ejemplo: a) Kuncava, C.; Shel, M.; *J. Sol Gel Sci. Technol.*, **1997**, *8*, 667, b) Pierre, A.; Buisson, P.; *J. mol. Catal. B*, **2001**, *11*, 639, c) Han, A.; Foglia, T.; Shen, S.; *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2000**, *37*, 179

¹⁰⁹ Liu, S.; Sun, Y.; *Biosensors & bioelectronics*; **2007**, *22*, 905

¹¹⁰ Gutierrez, M.; jobágyy, M.; Rapun, N.; Ferrer, M.; Del Monte, F.; *Adv. Mater.*, **2006**, *18*, 1137

54 Capítulo 1. Introducción y objetivos

- Algunas proteínas no pueden ser cristalizadas fácilmente. Se encuentran a menudo dificultades en la purificación de la cantidad suficiente de proteína, obtención de cristales para la difracción de rayos X y otros aspectos técnicos.
- La cristalografía puede tardar desde varios meses a varios años para resolver/analizar la estructura de una proteína simple.
- La resonancia magnética nuclear es, en promedio, más rápida que la cristalografía pero no puede aplicarse hoy en día a proteínas con un gran número de residuos.
- Algunas proteínas que se obtienen son demasiado grandes para el análisis RMN y no pueden ser cristalizadas para aplicar la difracción de rayos X¹¹¹.

Dado que determinados residuos presentan una mayor frecuencia relativa de aparición en las estructuras secundarias y que la información necesaria para el correcto plegado de una proteína parece estar contenida en su estructura primaria, uno de los grandes retos de la bioinformática es la predicción de la estructura terciaria de las proteínas.

1.6.1- Métodos de modelización de proteínas

La predicción de la estructura a partir de la secuencia de aminoácidos resulta difícil, fundamentalmente debido a las interacciones de largo alcance que estabilizan las estructuras secundaria y terciaria. Para intentar resolver este problema se han diseñado tres aproximaciones:

- Modelado por homología
- *Threading* o reconocimiento de plegamiento
- Métodos *ab initio*¹¹²

En la modelización por homología, la construcción del modelo tridimensional de la proteína de estructura desconocida se basa en una o más proteínas relacionadas de estructura conocida (templados). Los métodos de reconocimiento de plegamiento o *threading* se basan en el hecho de que las proteínas generalmente adoptan plegamientos similares a pesar de que no haya una similitud significativa de secuencia o funcional. Los métodos *ab initio* predicen la estructura 3D a partir únicamente de su secuencia, lo que equivale a conocer el mecanismo de plegamiento de las

¹¹¹ Krieger, E.; Nabuurs, S.; Vriend, G.; Homology modelling. *Structural Bioinformatics*. Edit. Philip E. Bourne y Helge Weissig, by Wiley- Liss, Inc. 2003

¹¹² Fiser, A.; Sali, A; *Protein Science*, 2000, 9, 1753

55 Capítulo 1. Introducción y objetivos

proteínas. Parten de la conformación extendida de un péptido, reducen los grados de libertad de la proteína, mediante los denominados “modelos de complejidad reducida” (*reduced complexity models*) y utilizan funciones energéticas, normalmente derivadas a partir de bases de datos (*knowledge-based*) para evaluar cada una de las geometrías obtenidas.

En el presente trabajo se ha utilizado el método de modelado por homología para la predicción de la estructura tridimensional de la PPM de *E. coli*.

1.6.2- Modelado por homología.

El modelado por homología utiliza estructuras determinadas experimentalmente (templados) para predecir la conformación de otra proteína (*target*) que tiene una secuencia de aminoácidos similar al templado. Esta aproximación a la modelización de proteínas es posible debido a que pequeños cambios en la secuencia de una proteína usualmente resulta en un pequeño cambio en su estructura tridimensional. Se asume, de esta forma, que la estructura se conserva en mayor medida que la secuencia, de modo que si la proteína que se quiere modelar presenta más de un 30% de identidad con una proteína de estructura conocida, ambas proteínas pueden considerarse estructuralmente semejantes.

Las condiciones necesarias entonces para construir un correcto modelo de la proteína *target* basada en esta metodología son que la similitud entre la secuencia *target* y el/los templado/s sea elevada y que las secuencias puedan ser correctamente alineadas.

La modelización por homología es el único método que actualmente puede proporcionar modelos con un error en la desviación cuadrática media (*RMSD*) respecto al experimental inferior a 2 Å¹¹³.

En resumen, la modelización por homología se basa en dos grandes observaciones¹¹⁴:

- La estructura de una proteína está únicamente determinada por su secuencia de aminoácidos. Conocer la secuencia debería ser suficiente, al menos en teoría, para obtener la estructura.
- Durante la evolución, la estructura es más estable y cambia más lentamente que la secuencia asociada, con lo que secuencias similares adoptan prácticamente idénticas

¹¹³ Sanchez, R.; Sali, A.. *Current Opinion in Structural Biology*, 1997, 7, 206

¹¹⁴ Kinch, L.; Grishin, N.; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2002, 12, 400

56 Capítulo 1. Introducción y objetivos

estructuras, y secuencias relacionadas distantes en el tiempo todavía se pliegan en estructuras similares.

Para llevar a cabo esta metodología se siguen usualmente los siguientes cuatro pasos¹¹⁵ (Figura 1.22):

1. Búsqueda y selección de plantados
2. Correcto alineamiento secuencia plantilla- secuencia target.
3. Construcción y evaluación del modelo.
4. Refinamiento del modelo obtenido.

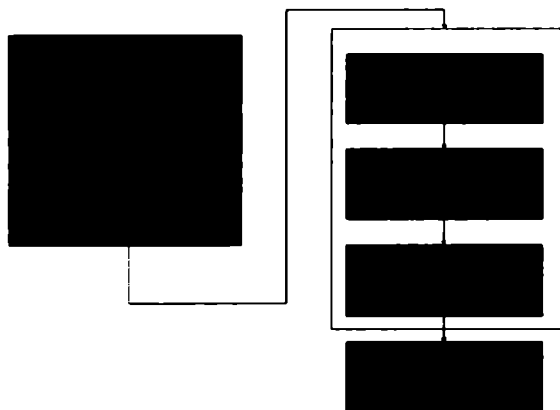


Figura 1.22. Modelado por homología.

Cada uno de estos pasos se describe a continuación.

1.6.2.1- Búsqueda de plantados

La modelización por homología comienza con la búsqueda de estructuras de proteínas conocidas en una base de datos, típicamente el *Protein Data Bank* (PDB)¹¹⁶ usando la secuencia de la proteína que se desea modelar como referencia. Las secuencias en la base de datos se comparan con la de referencia con el objeto de evaluar el grado de similitud existente entre

¹¹⁵ Jones, D.; A Practical Guide to Protein Structure Prediction. Edit. por Webster, D.; Ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2000

¹¹⁶ Berstein, F.; Koetzle, T.; Williams, G.; Meyer, E.; Brice, M.; Rodgers, J.; Kennard, O; Shimanouchi, T.; Tasumi, M. *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535

57 Capítulo 1. Introducción y objetivos

secuencias. Existen diversos métodos para la comparación secuencia – secuencia, así como muchos servidores de buscadores en base de datos. En este trabajo se utilizó el servidor denominado *HHpred server (Homology detection & structure prediction by HMM-HMM comparison)*¹¹⁷. El procedimiento de búsqueda que emplea el servidor se describe resumidamente a continuación: en primer lugar, se construye un alineamiento de secuencias homólogas a la secuencia depositada de la proteína *target*, por medio de iteraciones múltiples de búsquedas en el PSI-BLAST contra una base de datos no redundante depositada en el sitio de NCBI. Se predice asimismo la estructura secundaria de la proteína. En el paso siguiente, se genera un perfil de modelo oculto de Markov (*HMM profiles*, describen una familia o patrón de secuencias) a partir del alineamiento múltiple que incluye la información acerca de la estructura secundaria predicha. El modelo de Markov se compara luego, con cada HMM en la base de datos seleccionada (comparación de HMM-HMM). Se ha reportado que el uso de esta metodología, ofrece resultados o alineamientos en menor tiempo, más sensibles (en particular en la búsqueda de homólogos remotos) y más precisos que las metodologías más sencillas de comparación de pares de residuos¹¹⁸.

Una vez obtenida la lista de los posibles templados, se selecciona/n el/los más apropiado/s, para realizar el modelado. Los criterios para seleccionar el/los templado/s óptimo/s son:

- Secuencias de mayor porcentaje de similitud con la secuencia *target* (mayor porcentaje de residuos idénticos y menor número de huecos, *gaps*, en el alineamiento).
- Otros factores que incluyen: ser el templado más cercano a la familia de la secuencia *target*, similitud en el entorno del templado con respecto al del *target* que precisa ser modelado (solvente, pH, ligandos, etc.), calidad de la estructura experimental.

1.6.2.2- Correcto alineamiento secuencia templado- secuencia target.

Este paso, en el que se establecen equivalencias estructurales y/o secuenciales entre la secuencia *target* y el templado es el más importante. El alineamiento es relativamente simple de obtener cuando la identidad de la secuencia *target*-templado está por encima del 40% con métodos de alineamiento secuencia-secuencia automáticos estándares. El correcto alineamiento de secuencias influirá gravemente en la precisión del modelo obtenido. Altas identidades de

¹¹⁷ Söding, J.; Biegert, A.; Lupas, A.; *Nucleic Acids Research*, 2005, 33; W244-W248

¹¹⁸ Söding, J. *Bioinformatics*, 2005, 21, 951–960

58 Capítulo 1. Introducción y objetivos

secuencias ($\geq 70\%$) generan modelos de alta precisión, con desviaciones (*RMSD*) de la estructura nativa menores de 1 Å. Pobres identidades de secuencias ($< 35\%$) indica generalmente que el alineamiento presenta huecos y alto porcentaje de residuos no alineados, por lo que se obtienen, en general, modelos pobres con *RMSD* mayores a 3Å. Identidades de secuencias intermedias (35%-70%) generaran modelos con *RMSD* intermedios a los valores citados previamente, como se muestra de forma aproximada en la **figura 1.23**.

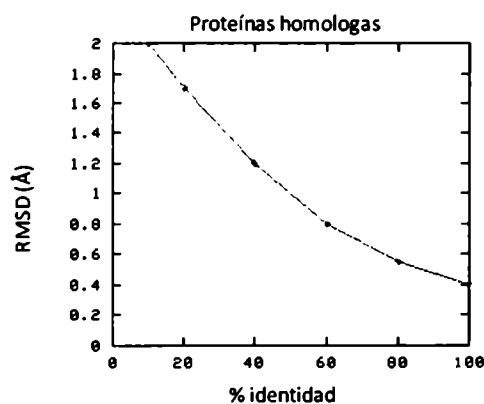


Figura 1.23. Representación de la variación en los valores de *RMSD* con el porcentaje de similitud entre secuencias.

1.6.2.3- Construcción y evaluación del modelo.

Una vez construido el alineamiento target-templado, se pueden utilizar diferentes métodos para la construcción del modelo 3D de la proteína target.

- El método original es el montaje de cuerpo rígido o *rigid-body assembly*¹¹⁹. Este método construye el modelo a partir de pequeñas regiones del *core*, de *loops* y de cadenas laterales, obtenidas al desagrupar y observar estructuras relacionadas.
- Otra familia de métodos se basa en las posiciones aproximadas de átomos conservados de los templados para calcular las coordenadas de otros átomos¹²⁰.
- El tercer grupo de métodos, el cual modela por satisfacción de restricciones espaciales, usa tanto distancias como técnicas de optimización para satisfacer restricciones espaciales obtenidas del alineamiento de la secuencia *target* con las estructuras del templado. Estos

¹¹⁹ Blundell, T.; Sibanda, B.; Sternberg, M.; Thornton, J.; *Nature*, 1987, 326, 347

¹²⁰ Levitt, M.; *J. Mol. Biol.* 1992, 226, 507

métodos son implementados por programas como Modeller¹²¹. Este programa fue el utilizado en esta tesis para generar el modelo aproximado.

Después de la construcción del modelo, es importante comprobar la presencia de errores. Se pueden llevar a cabo dos tipos de validaciones¹²²:

- Evaluación interna de la consistencia del modelo, la cual comprueba si el modelo satisface las restricciones usadas para calcularlo.
- Evaluación externa, la cual se refiere a información que no ha sido usada en el cálculo del modelo.

Para la evaluación se utilizó la versión en línea del programa Verify3D. Este programa analiza la compatibilidad de un modelo atómico (3D) con su propia secuencia de aminoácidos (1D). Se le asigna a cada residuo una clase estructural sobre la base de su ubicación y entorno (alfa, beta, giro, polares, no polares, etc.). Se utiliza una colección de estructuras correctas como referencias para obtener un *score* o puntuación para cada uno de los 20 aminoácidos en cada clase estructural. Las puntuaciones se grafican, mostrando la fiabilidad del modelo atómico obtenido.

Asimismo se ha utilizado como criterio de validación el gráfico de Ramachandran (**Figura 1.24**), en éste se grafican los valores de los ángulos Psi-Phi para todos los aminoácidos. Idealmente se espera que al menos el 90% de los aminoácidos se encuentren en las regiones “más favorables” que se observan comúnmente en las proteínas.

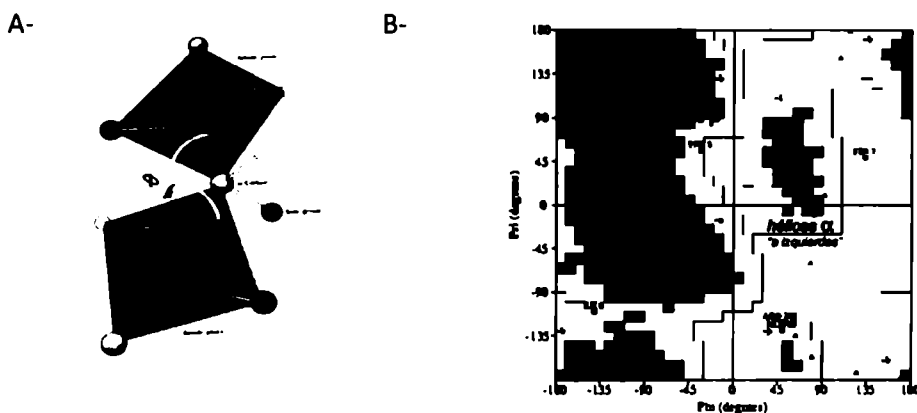


Figura 1.24. A- Esquema del enlace peptídico mostrando los ángulos que lo definen. B- gráfico de Ramachandran: Indican las zonas de dispersión aceptables para los valores de los ángulos de torsión

¹²¹ Sali, A.; Blundell, T.; *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 779

¹²² Lüthy, R.; Bowie, J.; Eisenberg, D.; *Nature*, **1992**, *356*, 83

1.6.2.4- Refinamiento del modelo obtenido.

La última parte del modelado por homología puede consistir en un número diverso de pasos, según sea la precisión del modelo obtenido y el requerido (o sea, como se ha explicado con anterioridad del porcentaje de similitud y número de huecos encontrados entre la secuencia *target* y la del templado). Más allá de los pasos comunes de refinamiento por optimización de geometría molecular y dinámica molecular (que se detallarán a continuación), en el caso de metaloproteínas se añade la necesidad de incorporar los metales al modelo obtenido.

Optimización de geometría o minimización de energía.

Existen dos grandes áreas en química computacional para el desarrollo de modelos moleculares: las técnicas de Mecánica Molecular (modelos clásicos) y las de Mecánica Cuántica (modelos cuánticos).

Esta parte de la modelización molecular de la proteína se desarrolló mediante el uso de técnicas de mecánica molecular. La mecánica molecular considera los átomos como bolas unidas por resortes (representando los enlaces entre átomos) según los criterios de la física clásica. A pesar de reducir la precisión en la descripción de los sistemas, los métodos de mecánica molecular permiten abordar satisfactoriamente problemas a una escala de tamaño o de tiempo de simulación mayor que los que se basan en la mecánica cuántica

Para definir el sistema en Mecánica Molecular, se utilizan los denominados campos de fuerza o *force fields*¹²³. Los campos de fuerza están caracterizados por un conjunto de ecuaciones que definen como varía la energía potencial de la molécula con las posiciones de los átomos que la componen. Este campo de fuerzas requiere la utilización de parámetros como constantes de fuerzas, longitudes de enlace, etc. Los electrones no son tratados explícitamente en este tipo de métodos. Los efectos electrónicos se incluyen implícitamente a través de estos parámetros.

Existe una gran diversidad de campos de fuerza según se apliquen a diferentes aspectos de la química bioorgánica. Así, se pueden diferenciar campos de fuerza dirigidos a moléculas pequeñas

¹²³ Hermans, J.; Berendsen, H.; Van Gunsteren, W.; Postma, J.; *Biopolimers*, 1984, 23, 1

61 Capítulo 1. Introducción y objetivos

y medianas (MM2, MM3, MM4, TRIPOS, MMFF94) y a macromoléculas (AMBER¹²⁴, CHARMM¹²⁵, GROMOS¹²⁶, OPLS¹²⁷).

En este proyecto se ha trabajado con el *force field* AMBER para la optimización de la geometría de la proteína en estudio y dinámica molecular. AMBER fue originalmente parametrizado para un número limitado de sistemas orgánicos, como pequeñas moléculas o polímeros, y ha sido utilizado ampliamente para proteínas y ácidos nucleicos. AMBER utiliza una representación *united atom*, lo cual implica que los hidrógenos no polares no son representados explícitamente, pero se tienen en cuenta en la descripción de los átomos pesados a los que están unidos. Ello resulta en una rapidez adicional significativa en cálculos basados en AMBER en comparación a otros campos.

La optimización de la geometría de un sistema molecular consiste en localizar la estructura molecular con menor energía. Los métodos habituales de optimización de geometría se basan en el cálculo de las derivadas de la energía con respecto a los grados de libertad geométricos. Los métodos derivativos se diferencian entre los de orden uno y orden dos. Los métodos derivativos de orden uno son los basados en el gradiente de energía, los cuales buscan desplazar el sistema en una dirección que conduzca a un valor menor de energía. Estos métodos presentan el inconveniente de tender a conducir el sistema hacia mínimos de energía próximos a la posición de partida (mínimos locales), los cuales no tienen por qué coincidir con el mínimo global correspondiente a la geometría óptima que se pretende hallar.

Dinámica Molecular

La dinámica molecular es una disciplina particular del modelado molecular que explora el movimiento de las moléculas. Utiliza soluciones numéricas de la ecuación de movimiento de Newton, sobre un modelo que representa un sistema molecular, para simular el movimiento atómico y así obtener información acerca de las propiedades dependientes del tiempo de dicho sistema.

Para definir, pues, la superficie de energía potencial dejando que el sistema evolucione a lo largo del tiempo, se empieza con una conformación de partida químicamente plausible (conformación de menor energía obtenida por la optimización geométrica del modelo) y se

¹²⁴ Cornell, W.; Cieplak, P.; Bayly, C.; Gould, I.; Merz, K.; Ferguson, J.; Spellmeyer, D.; Fox, T.; Caldwell, J.; Kollman, P.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5179

¹²⁵ Brooks, B.; Bruccoleri, R.; Olafson, B.; States, D.; Swaminathan, S; Karplus, M.; *J. Comput. Chem.*, **1983**, *4*, 187

¹²⁶ Hermans, J.; Berendsen, H.; Van Gunsteren, W.; Postma, J.; *Biopolymers*, **1984**, *23*, 1513

calculan las cargas parciales. Se calculan las fuerzas que actúan mediante la integración de las ecuaciones de Newton, se deja que el sistema evolucione a lo largo del tiempo, con lo que cambian las posiciones de los átomos, se calcula la energía de la nueva conformación y se vuelven a calcular las fuerzas, volviendo a integrar las ecuaciones de Newton, repitiendo así el ciclo a lo largo del tiempo. Cuanto más tiempo pase más cambios se podrán calcular, lo cual implica mayor número de conformaciones exploradas y mejor descripción del sistema.

Los estudios de dinámica molecular permiten la exploración conformacional más eficiente que los métodos anteriormente citados. Esto es, se exploran las geometrías posibles del sistema de una manera más exhaustiva que mediante los métodos de optimización de geometría basados en el gradiente.

1.6.3- Evaluación de la interacción Proteína-Ligando

En función de la información experimental de la que se disponga, la predicción de la unión proteína-ligando puede ser más o menos costosa. Si se dispone de la proteína cristalizada, frecuentemente es posible encontrar complejos ligando-receptor cristalizados, los cuales permiten estudiar la posición de distintos ligandos en el sitio activo de la proteína. Por otra parte, si se disponen de datos biológicos que informen sobre las interacciones entre ligando-proteína (como experimentos de mutagénesis dirigida), se puede deducir también el modo de unión del ligando al sitio activo. Con estas informaciones, se puede realizar un acoplamiento manual entre ligando y receptor mediante programas de modelización molecular para obtener así modelos que expliquen en lo posible los datos experimentales. Sin embargo, si no se disponen de datos experimentales, existen métodos automáticos para explorar las posibles uniones entre ligando y proteína. Son los denominados programas de acoplamiento molecular o *docking*¹²⁸, los cuales realizan una exploración de todas las posibles posiciones relativas ligando-proteína, evaluando la interacción intermolecular entre ambos. Como resultado de esta exploración, se obtienen una serie de posibles conformaciones para la unión ligando-proteína. Cada una de estas soluciones se evalúa mediante una función de puntuación o *scoring*. En la forma más general del *docking* no se disponen de datos bioquímicos adicionales, pero disponer de información complementaria facilita el problema del *docking* considerablemente.

¹²⁷ Damm, W.; Frontera, A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L.; *J. Comput. Chem.*, **1997**, *18*, 1955

¹²⁸ Halperin, I.; Ma, B.; Wolfson, H.; Nussinov, R.; *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **2002**, *47*, 409

63 Capítulo 1. Introducción y objetivos

Básicamente son esenciales tres pasos para una buena predicción del complejo proteína/ligando: definición de la estructura de la molécula target, localización del sitio de unión y determinación del modo de unión. Idealmente la estructura de la molécula target debería estar determinada experimentalmente, aunque algunas aplicaciones de *docking* utilizan proteínas modeladas, si éstas no se pueden obtener de manera experimental¹²⁹. El segundo paso, la localización del sitio de unión, puede ser llevado a cabo computacionalmente (por software específicos para dicha tarea), y a su vez, por comparación con las regiones aminoacídicas conservadas en diversos miembros de la familia de la proteína en estudio y de proteínas relacionadas. El tercer paso, es la "típica" aplicación de los algoritmos de *docking*: dado el sitio de unión de una molécula, determinar el modo de unión a un ligando.

Existen tres pasos claves en el *docking*: representación del sistema, búsqueda conformacional y *ranking* de las soluciones potenciales.

El *docking* simula esencialmente la interacción con las superficies de la proteína. Dicha superficie se puede describir mediante modelos matemáticos, como descriptores, o mediante una grilla de afinidad o *grid*. Además, la proteína puede tratarse de manera estática o dinámica (proteína flexible o rígida). La mayoría de las aproximaciones consideran la proteína casi totalmente rígida o con flexibilidad parcial en las cadenas laterales y permiten flexibilidad al ligando.

Un algoritmo de búsqueda riguroso podría muestrear todos los modos de unión entre dos moléculas. Sin embargo, esto es impráctico debido al gran tamaño del espacio conformacional. Consecuentemente, sólo una pequeña parte del mismo puede ser muestreado, por lo que se debe establecer un compromiso entre el coste computacional y la cantidad de espacio conformacional examinado.

Entre los algoritmos de búsqueda más utilizados se pueden nombrar: SA, que es el método original de Monte Carlo; GA, el algoritmo genético tradicional darwiniano; LS, de búsqueda local; y GA-LS que es un algoritmo genético híbrido con búsqueda local. El GA-LS también se conoce como algoritmo genético lamarckiano o LGA.

Los métodos de *docking* iniciales se basaban en el principio de la llave y cerradura, lo que llevó a utilizar sólo criterios geométricos al evaluar el grado de complementariedad estérica entre ligando y sitio de unión. Sin embargo, pronto la complementariedad química se empezó a tener en

¹²⁹ Hetényi, C.; Van der Spoel, D;. *Prot. Sci.*, 2002, 11, 11729

64 Capítulo 1. Introducción y objetivos

cuenta en las aproximaciones de *docking* para reducir el número de falsos positivos obtenidos mediante los criterios de forma únicamente. Por lo que se introdujeron las funciones de puntuación o *scoring*, basadas en campos de fuerza o *force fields* de mecánica molecular para estimar la interacción proteína-ligando. Las funciones de *scoring* son un componente imprescindible de los algoritmos de *docking*, se utilizan mayoritariamente para predecir la afinidad de unión entre ligando y proteína de manera aproximada, ya que las funciones usadas para describir la química y física de la unión de un ligando a su sitio de unión están incompletas todavía¹³⁰. No predice los valores absolutos de la energía libre de unión, sino que predice de manera aproximada el orden relativo en cuanto a afinidad de las moléculas doqueadas. Las funciones de *scoring* se pueden agrupar en tres clases: funciones basadas en campos de fuerza o *force-field based*, funciones basadas en el conocimiento o *knowledge-based* y funciones empíricas de evaluación o *empirical scoring functions*.

Se han desarrollado un amplio número de programas que realizan experimentos de acoplamiento molecular, como por ejemplo FlexX, DOCK, GOLD, AutoDOCK y GLIDE que difieren en los algoritmos de búsqueda implementados así como en las funciones de *scoring*.

En esta tesis se utilizó el programa autodock 4.0.

1.6.3.1- Experimentos de acoplamiento molecular utilizando autodock.

Autodock 4.0 utiliza dinámica molecular para la predicción de la unión de un ligando flexible a un sitio de unión de una proteína rígida. Para una máxima exactitud de predicción así como de un tiempo de cálculo computacional razonable, utiliza el campo de fuerza AMBER, en conjunto con funciones empíricas de evaluación (denominadas *Docked energy*)¹³¹. Las funciones de *scoring* empíricas o *empirical scoring functions* estiman la energía libre de unión sumando términos de interacción derivados de parámetros estructurales obtenidos de manera empírica. Se obtienen ajustando la función de *scoring* a constantes experimentales de un conjunto de prueba de complejos proteína-ligando. La función de *scoring* típica consiste en cinco contribuciones, las cuales representan enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas y lipofílicas, y la pérdida de

¹³⁰ Ajay, W.; Murcko, M.; *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 4953

¹³¹ Morris, G.; Goodsell, D.; Huey, R.; Olson, A.; *J. Computer-Aided Molecular Design*, **1996**, *10*, 293

65 Capítulo 1. Introducción y objetivos

entropía externa y configuracional en la unión. Por último se eligió para las simulaciones, el algoritmo de búsqueda GA-LS, ya que ha sido reportado como el más robusto y eficiente¹³².

Los componentes individuales del programa son AutoTors, AutoGrid, y AutoDock. AutoTors define cuáles enlaces en el ligando son flexibles, afectando de esta forma los grados de libertad del ligando¹³³. Por lo que, en general, ligandos grandes con muchos ángulos de torsión son demasiado complejos de analizar. AutoGrid pre-calcula una grilla de energías de interacción 3D basado en la proteína, utilizando el campo de fuerzas AMBER. Esta puede ser seleccionada manualmente conociendo de antemano el sitio de unión al ligando. De las dimensiones de la grilla dependerá el tiempo de cálculo requerido para la simulación.

Luego de completar la grilla, Autodock comienza la simulación. El programa Autodock devuelve dos evaluaciones: la energía de *docking* o Docked energy (la cual incluye las interacciones intermoleculares ligando-proteína e intramoleculares del ligando) y la energía de unión o Binding energy (la cual incluye la energía intermolecular ligando-proteína y la energía libre debida a las torsiones del ligando). Estos resultados se muestran en forma de gráficos de energía (eje X) contra conformaciones posibles (eje Y) llamados *clusters*. Se registran en formas de columnas donde se acoplan en una misma columna conformaciones con energía y posiciones similares.

El experimento de acoplamiento molecular llevado a cabo en esta tesis presenta dos desafíos. El primero, es el uso de un modelo generado por modelado por homología. Estos modelos, en general, presentan menores precisiones que los obtenidos a través de determinaciones estructurales por cristalografía de rayos X o RMN. El segundo refiere a las dificultades inherentes al *docking* de ligandos en estructuras de metaloproteínas. En el primer caso, se han publicado un gran número de estudios del uso de modelos de proteínas generados por esta metodología para realizar experimentos de *docking*¹³⁴. Concerniente a modelos obtenidos por modelado por homología con similitudes de secuencias entre 30% y 50% (de moderada precisión) se ha reportado que estos modelos pueden ser utilizados directamente para los experimentos de *docking* de pequeñas moléculas si son construidos y refinados mediante

¹³² Brooijmans, N.; Kuntz, I.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2003** ;32, 335

¹³³ Goodsell, D.; Morris, G.; Olson, A.; *J. Mol. Rec.*, **1996**, 9, 1

¹³⁴ a) Sinding, K.; Søren Bak, T.; Olsen, E.; Imberty, A.; Breton, C.; Lindberg Møller, B.; *Plant Physiol*, **2005**, 139, 664, b) Iorga, B.; Herlem, D.; Barré, E.; Guillou, C.; *J. Mol. Model.*, **2006**, 12, 366, c) Radestock, S.; Weil, T.; Renner, S.; *J. Chem. Inf. Model.*, **2008**, 48, 1104, e) Schafferhans, A.; Klebe, G.; *J. Mol. Biol.*, **2001**, 307, 407

simulaciones de dinámica molecular, o si se considera, en los experimentos, la flexibilidad de la proteína¹³⁵.

En el segundo caso, el *docking* de moléculas en sitios activos que contengan uno o más metales es muy desafiante debido a las múltiples geometrías posibles de coordinación y asimismo debido a la falta de parámetros de campos de fuerza suficientemente precisos para las interacciones ligando-metal¹³⁶. Con respecto al tratamiento de la coordinación del metal, se sabe que los programas actuales que realizan experimentos de *docking* son deficientes en este particular caso. En estudios anteriores se ha comparado el desempeño de diversos programas de *docking*, mediante experimentos de acoplamiento molecular de sustratos llevados a cabo sobre sitios activos de metaloproteínas. El resultado de estos estudios mostró que el programa AUTODOCK¹¹ era el más confiable para este tipo de experimentos¹³⁷.

1.7 Resumen de objetivos

El objetivo general de este trabajo de tesis ha sido generar una estrategia versátil y económica para la síntesis tanto de nucleósidos naturales como de nucleósidos modificados partiendo de los azúcares naturales. La aproximación quimioenzimática de síntesis de nucleósidos que decidimos explorar se encuentra resumida en la **Figura 1.12**.

La hipótesis básica de la estrategia enzimática utilizando las enzimas PPM y NPs está asociada a la disponibilidad de las correspondientes furanosas 5-fosfato como materiales de partida. Por lo que se planteó una estrategia quimio-enzimática para la obtención de estos compuestos, que comprende en primer lugar un esquema quimioenzimático de protección-desprotección selectivo, seguido de una fosforilación química (**Figura 1.26**). Tomando como base trabajos previos, en el presente trabajo de tesis se decidió encarar el estudio de reacciones de acetilación química de diversas furanosas y su posterior desacetilación enzimática, con el objeto de obtener las mismas con la posición primaria libre. Se utilizaron diversas fuentes enzimáticas (lipasas e hidrolasas vegetales) con el objeto de extender el conocimiento relacionado a la regioselectividad de los biocatalizadores en las reacciones de desacetilación.

¹³⁵ Krovat, E.; Steindl T.; Langer, T.; *Current Computer-Aided Drug Design*, 2005,1, 93

¹³⁶ Ver por ejemplo: a). Hu, X.; Balaz, S.; Shelver .W.; *J. Mol. Graph. Model.*, 2004, 22, 293, b). Irwin, J.; Raushel, F.; Shoichet, B.; *Biochemistry*, 2005, 44, 12316

¹³⁷ Chen, D.; Menche, G.; Power, T.; Sower, L.; Peterson, J.; Schein, C.; *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2007, 67, 593

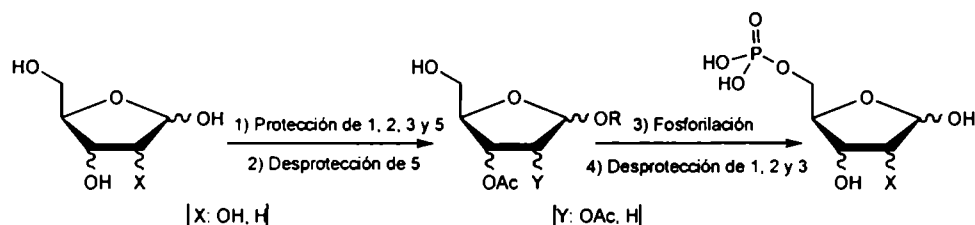


Figura 1.26. Esquema general de la síntesis de furanosas 5-fosfato.

Una vez obtenidas las furanosas regioselectivamente con la posición 5 libre, se proyectó estudiar diversas reacciones de fosforilación química con el objeto de obtener las correspondientes furanosas 5-fosfato.

- Obtención enzimática de nucleósidos partiendo de furanosas 5-fosfato y bases

Con las furanosas 5-fosfato en mano, se decidió explorar la reacción de síntesis enzimática de nucleósidos mediante el acoplamiento de las enzimas NPs con la PPM (Figura 1.27).

Para la consecución de este objetivo, y debido a que la PPM de *E. coli* no es una enzima comercial, se planteó, en primer medida, sobreexpresar la misma en un sistema adecuado, mediante la aplicación de metodologías usuales de biología molecular. Esto se realizó bajo la supervisión del Dr. Claudio Pereira y el Lic. Leon Beauvier. Una vez halladas las mejores condiciones para la expresión enzimática, se planteó la optimización de las condiciones de reacción para evaluar su impacto en la cinética y los rendimientos de las reacciones de síntesis de nucleósidos.

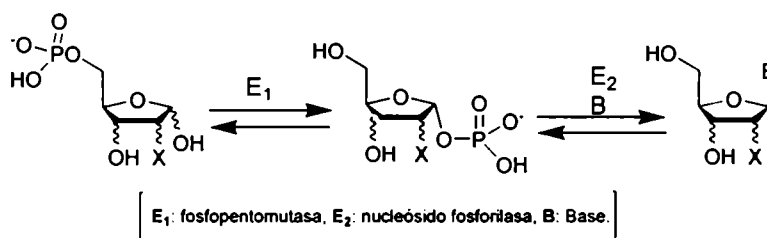


Figura 1.27. Síntesis enzimática de nucleósidos

Por último, con el objeto de demostrar el alcance de la estrategia quimio-enzimática planteada, se sintetizaron tanto nucleósidos naturales como modificados, utilizando como biocatalizador el sistema enzimático acoplado formado por la enzima recombinante PPM y

68 Capítulo 1. Introducción y objetivos

nucleósido fosforilasas (NPs) comerciales, partiendo de pentosas 5-fosfato y bases purínicas y pirimidínicas (Figura 1.27).

- Inmovilización eficiente de la PPM y co-inmovilización del sistema enzimática acoplado (PPM-NP)

Con el objeto de abordar futuros estudios de escalado de la reacción, se propuso llevar a cabo la inmovilización de la PPM y co-inmovilización del sistema enzimática acoplado (PPM-NP) para de esta forma aprovechar las ventajas descritas anteriormente concernientes a inmovilización de enzimas, como ser el aumento en la estabilidad de la/s enzima, y la posibilidad de re-utilización del biocatalizador inmovilizado. Para lograr este objetivo, se han analizado diversas metodologías de inmovilización, así como diversos soportes. Parte de este desarrollo se realizó con la colaboración del Dr. Matias Jobbajy.

- Estudio estructural y funcional de la enzima PPM recombinante

Por último, se planteó la elucidación estructural de la enzima recombinante expresada en nuestro laboratorio (PPM de *E. coli*), la determinación del sitio activo de la misma y el modo de unión de los ligandos. Esto se llevó a cabo con el objeto de:

- Comprender el mecanismo biológico fundamental de la enzima PPM y los modos de unión de los ligandos al sitio activo de la enzima.
- Proyectar un diseño racional de mutantes, con el objeto de aumentar la estabilidad de la enzima, ampliar su perfil de pH y la especificidad de los sustratos 5-fosfato. Esto último permitiría la síntesis biocatalizada de nuevos nucleósidos modificados en el azúcar.
- La predicción de las propiedades físico-químicas de la enzima. Esto posibilitará, en un futuro, evaluar la distribución de cargas y los residuos expuestos al solvente, permitiendo una selección más racional de la metodología de inmovilización.

El estudio estructural y funcional de la PPM fue realizado con la supervisión de la Dra. Anna Tramontano.

Capítulo 2**Parte experimental****2.1- Materiales****2.1.1- Reactivos**

Acetato de etilo	J.T.Baker
Acetonitrilo	J.T.Baker
Ácido acético	Merck
Ácido Bórico	Merck
Ácido clorhídrico	Merck
Ácido etilendiaminotetracético	GIBCO BRL
Ácido fosfórico	J.T.Baker
Ácido p-toluensulfónico monohidrato	ICN Biomedicals
Ácido sulfúrico	Merck
Acrilamida	GIBCO BRL
Adenina	Pharma Waldhof
Adenosina	Pharma Waldhof
Agar	GIBCO BRL
Agarosa	GIBCO BRL
Agua deuterada	Aldrich
Alcohol isoamilico	Merck
Alcohol n-butílico	J.T.Baker
Alcohol polivinílico	Sigma
2-Amino-6-cloro-9-(β -D-ribofuranosil) purina	Sigma-Aldrich
Amoníaco	Merck
Ampicilina	Sigma-Aldrich
Anhídrido acético	J.T.Baker
L-arabinosa	Sigma
Arabinofuranosil adenina	Sigma-Aldrich
Argón	AGA
Azul de bromofenol	SIGMA
Benzofenona	Riedel-de-Haën
Bicarbonato de sodio	Mallinckrodt
Bisulfito de sodio	J.T.Baker
Borohidruro de sodio	Aldrich
5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido	Sigma-Aldrich
5-Bromo-2'-desoxiuridina	Sigma-Aldrich
Carbonato de potasio	Anedra
Carbonato de sodio	Mallinckrodt
Cloranfenicol	Sigma-Aldrich
6-Cloro-2-aminopurina,	Sigma-Aldrich

Cloroformo	Merck
Cloroformo deuterado	Aldrich
Cloruro de 4-4'-dimetoxitritilo	ICN Biomedicals
Cloruro de bario	Anedra
Cloruro de manganeso	Anedra
Cloruro de mesitileno	Aldrich
Cloruro de p-toluensulfonilo	ICN
Cloruro de sodio	Aldrich
D-Arabinosa	Sigma-Aldrich
1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octano	Sigma-Aldrich
2'-Desoxiuridina	Sigma-Aldrich
Dibencil <i>N,N</i> -diisopropilfosforamidita	Sigma-Aldrich
Dibenzo-18-corona-6	Aldrich
Diclorometano	J.T.Baker
Difenilclorofosfato	Sigma-Aldrich
4-Dimetilaminopiridina	Sigma-Aldrich
Dimetilformamida	J.T.Baker
Dimetilsulfóxido	J.T.Baker
Dimetilsulfóxido deuterado	Aldrich
EDC	Sigma-Aldrich
Etanol absoluto	Merck
Éter etílico	Merck
Etilenglicol	Sigma-Aldrich
Fenol	J.T.Baker
5-Fluoro-2'-desoxiuridina	Sigma-Aldrich
2-Fluoropurina	Sigma-Aldrich
5-Fluorotimina	Sigma-Aldrich
5-Fluoruracilo	Sigma-Aldrich
Glicerol	Merck
Glucosa-2.6-difosfato	Sigma-Aldrich
Glutaraldehido	Sigma-Aldrich
Guanina	Sigma-Aldrich
Guanosina	Sigma-Aldrich
Hidróxido de paladio	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sodio	Merck
Hidruro de calcio	Aldrich
Hidruro de potasio	Aldrich
Hipoxantina	Sigma-Aldrich
1H-Imidazol	Sigma-Aldrich
Inosina	Sigma-Aldrich
IPTG	Sigma-Aldrich
Isopropanol	J.T.Baker
Marcador de PM de proteínas	Aldrich
β -Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
6-Mercapto purina	Sigma-Aldrich
6-Mercaptopurin-9- β -D-ribofuranósido	Sigma-Aldrich
Metanol	J.T.Baker
<i>N,N'</i> -Metilbisacrilamida	GIBCO BRL
<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina	Aldrich

Nitrógeno	AGA
Oxiclورو de fósforo	Sigma-Aldrich
Pentóxido de fósforo	Merck
Persulfato de amonio	GIBCO BRL
Piridina	J.T.Baker
Quitosano	Sigma-Aldrich
D-ribosa	Sigma-Aldrich
1-(β-D-ribofuranosil)-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida	Sigma-Aldrich
Sulfato de sodio anhidro	J.T.Baker
Ter butil hidroperóxido	Sigma-Aldrich
Terbutilhidropirano	Sigma-Aldrich
Tetraetilen-orto-silicato	Sigma-Aldrich
Tetrahidrofurano	J.T.Baker
1H-Tetrazol	Sigma-Aldrich
Timidina	Sigma-Aldrich
Timina	Sigma-Aldrich
Tolueno	J.T.Baker
1,2,4-Triazol-3-carbozamida	Sigma-Aldrich
Trietilamina	Pharma Waldhof
Tris [tris(hidroximetil)aminometano]-hidrocloruro	GIBCO BRL
Uracilo	Sigma-Aldrich
Urea	GIBCO BRL
Uridina	Sigma-Aldrich
Xileno	Sigma
D-xilosa	Sigma-Aldrich
Yodo	Merck

2.1.2- Cromatografía y material para purificación

Columna HPLC Apollo C18 5u 150mmx4.6mm	Alltech
Placas de aluminio de silica gel 60F ₂₅₄	Merck
Resina Dowex X2-200	Bio-Rad
Silica gel 60F, grano 200-300	Merck
Columna Ni-NTA	QIAGEN

2.1.3- Enzimas

T4 DNA ligasa	GIBCO BRL
EcoRI	Biotech
HindIII	Amersham Pharmacia
PstI	Amersham Pharmacia
Purin nucleósido fosforilasa (origen bacteriano)	Sigma-Aldrich

Timidin fosforilasa (<i>E.coli</i>)	Sigma-Aldrich
EnterokinaseMax™	QIAGEN

2.1.4- Sistemas de vectores

pRSET-A	Invitrogen
pGEM-TEasy	Promega

2.1.5- Buffers y medio de cultivo

-Buffer PCR

Taq 1X PCR easy (pH 8.3)	KCl 500 mM
	Tris-HCl 100 mM
	MgCl ₂ 15 mM

-Buffers utilizados en electroforesis en gel de agarosa

TAE 1X, pH= 8.1	Tris base 40 mM
	Ácido acético 20 mM 1
	EDTA 1mM

Buffer de carga

Glicerol 30% (v/v)
Azul de Bromofenol 0.25 % (p/v)
Xilen Ciano IFF 0.25 % (p/v)

-Buffer de ligado rápido

(T4 DNA ligasa) pH = 7.8	Tris-Cl 60 mM
	MgCl ₂ 20 mM
	DTT 20 mM
	ATP 2 mM
	PEG 10% (Mr 8000)

-Buffers utilizados en la purificación de la enzima recombinante por cromatofia de afinidad (NI-NTA, QIAGEN)

Buffer de lisis (pH = 8.0)	NaH ₂ PO ₄ 50 mM
	NaCl 0.5 M
	1-H imidazol 0.01 M

Buffer de lavado (pH = 8.0)	NaH ₂ PO ₄ 50 mM NaCl 0.5 M 1-H imidazol 0.02 M
Buffer de elución (pH = 8.0)	NaH ₂ PO ₄ 45 mM NaCl 0.45 M 1-H imidazol 0.5 M
-Buffers utilizados en electroforesis en gel de poliacrilamida	
Buffer de migración	Tris-HCl 25 mM Glicina 200 mM SDS 0.1% (p/v)
Buffer de carga	SDS 10% (p/v) β -mercaptoetanol 10 mM Glicerol 20 % (v/v) Tris-HCl, pH 6.8 0.2 M Azul de bromofenol 0.05% (p/v)
-Medio de cultivo	
LB (líquido, pH = 7.0)	Extracto de levadura 0.5% (p/v) Peptona 1% (p/v) NaCl 1% (p/v)
LB (sólido, pH = 7.0)	Idem medio líquido + agar 0.75% (p/v)

2.2- Consideraciones generales

Las purificaciones de los productos orgánicos fueron realizadas utilizando cromatografía en columna de silicagel 60 grano 200-300. El análisis y seguimiento de las reacciones fue llevado a cabo por cromatografía en capa delgada (c.c.d.) utilizando placas de aluminio recubiertas con silicagel comerciales (60F₂₅₄). Los componentes fueron localizados por medio de carbonización con ácido sulfúrico diluido y calor, o con luz UV a 254 nm. También se utilizó yodo como revelador en los casos en que fuera necesario.

Las evaporaciones fueron llevadas a cabo en un evaporador rotatorio marca Büchi con una trampa de frío -100 °C utilizando una bomba de vacío.

Los solventes fueron secados en atmósfera de Nitrógeno. El THF fue reflujo sobre sodio metálico utilizando benzofenona como indicador de humedad. La DMF fue secada por calentamiento con hidruro de calcio y luego destilada a presión reducida. La trietilamina (TEA) y la piridina (Py) fueron secadas por calentamiento a reflujo con hidruro de calcio y destilados a presión atmosférica.

Los reactivos sensibles a la humedad fueron transferidos *vía* jeringa bajo presión positiva de nitrógeno o argón. Las reacciones fueron llevadas a cabo bajo presión positiva de nitrógeno.

Las estructuras fueron determinadas utilizando resonancia magnética nuclear de ^1H ^{13}C y ^{31}P en un equipo Bruker de 500 MHz o de 200 MHz. Los espectros fueron realizados utilizando CDCl_3 , DMSO-d_6 , D_2O (estándares internos ver **Tabla 2.1**) y H_3PO_4 como estándar externo. Los desplazamientos químicos citados como multipletes están referidos al centro aproximado de la señal.

solvente	Compuesto de ref. $^1\text{H-RMN}^*$ (ppm)	Compuesto de ref. $^{13}\text{C-RMN}^*$ (ppm)	Compuesto de ref. $^{31}\text{P-RMN}^{**}$ (ppm)
CDCl_3	TMS (0.00)	CDCl_3 (76.96 (3))	H_3PO_4 (0,00)
DMSO-d_6	TMS (0.00)	DMSO-d_6 (39.5 (7))	H_3PO_4 (0,00)
D_2O	DSS (0.00)	DSS (-1.84)	H_3PO_4 (0,00)

* estándar interno

** estándar externo

Tabla 2.1. Sistemas de referencia utilizados en Resonancia Magnética Nuclear

Todas las reacciones enzimáticas fueron llevadas adelante en un agitador orbital marca Ferca con control de temperatura y cuenta revoluciones.

Los rendimientos de las reacciones fueron calculados luego del paso de purificación.

El seguimiento de las reacciones biocatalizadas fue llevado a cabo utilizando un equipo de HPLC GILSON (módulo manométrico 805, mezclador dinámico 811B, bombas 305 y 306, detector UV modelo 116). En las primeras reacciones se utilizó un integrador Shimadzu, Chromatopac C-R6A. Luego se adquirió un conversor de datos analógicos conectado a una computadora personal.

2.3- Metodología

2.3.1- Síntesis quimioenzimática de pentofuranósidos diacetilados - Obtención de los productos triacetilados

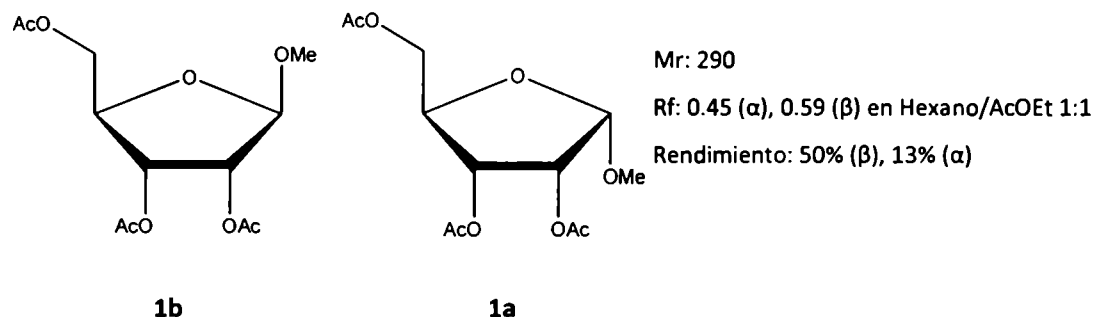
2.3.1.1- Síntesis de metil 2,3,5-tri-O-acetil-D/L-pentofuranósidos

Procedimiento general para la síntesis de metil 2,3,5-tri-O-acetil-D-pentofuranósidos

A una solución de 1 g de la furanosa correspondiente (6.66 mmol) en 23 ml de MEOH absoluto se agregaron 0.086 ml de H₂SO₄ (c) y CuSO₄ anh. (1.1 g, 0.007 mmol). Esta solución se calentó a 50 °C por aprox. 24 hs. Luego, la mezcla enfriada, fue neutralizada con 0.4 g de NaHCO₃. Las sales insolubles fueron removidas por filtración y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida hasta obtener un aceite. El mismo fue evaporado dos veces a presión reducida de Py anh. y posteriormente se disolvió en este mismo solvente (35ml). Luego se agregó a la solución, anhídrido acético (5.8 ml, 0.061 mmol) previamente destilado y cantidades catalíticas de DMAP. La mezcla se dejó a temperatura ambiente bajo agitación, aprox. 6 h, y fue posteriormente concentrada bajo presión reducida a sequedad. La misma se purificó en una columna de sílica gel, utilizando mezclas de Hexano: AcOEt como eluyente.

De esta forma se obtuvieron los siguientes compuestos:

Metil 2,3,5-tri-O-acetil- α -D-ribofuranósido (1a) y metil 2,3,5-tri-O-acetil- β -D-ribofuranósido (1b):



Anomero β

Espectro de ¹H RMN (Cl₃CD, 500 MHz): δ 2.06 (s, 3H, -CH₃), 2.09 (s, 3H, -CH₃), 2.11 (s, 3H, -CH₃), 3.40 (s, 3H, -OCH₃), 4.11 (dd, J₁ = 5.8 Hz, J₂ = 11.8 Hz, 1H, H-5'), 4.30 (m, 1H, H-4), 4.36 (dd, J₁ = 3.9 Hz, J₂ = 11.8 Hz, 1H, H-5), 4.90 (d, J₁ = 0.8 Hz, 1H, H-1), 5.23 (dd, J₁ = 0.8 Hz, J₂ = 4.8 Hz, 1H, H-2), 5.32 (dd, J₁ = 4.9 Hz, J₂ = 6.8 Hz, 1H, H-3).

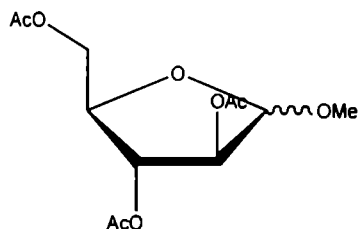
Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.34 (-CH₃), 20.42 (-CH₃), 20.61 (-CH₃), 55.11 (OCH₃), 64.29 (C-5), 71.44 (C-2), 74.54 (C-3), 78.47 (C-4), 106.14 (C-1), 169.47 (CO), 169.51 (CO), 170.46 (CO).

Anomero α

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 2.09 (s, 3H, -CH₃), 2.11 (s, 3H, -CH₃), 2.12 (s, 3H, -CH₃), 3.45 (s, 3H, -OCH₃), 4.21 (dd, $J_1 = 4.2$ Hz, $J_2 = 11.8$ Hz, 1H, H-5'), 4.27 (m, 1H, H-4), 4.36 (dd, $J_1 = 3.1$ Hz, $J_2 = 11.8$ Hz, 1H, H-5), 4.98 (dd, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz, 1H, H-2), 5.12 (d, $J_1 = 4.4$ Hz, 1H, H-1), 5.17 (dd, $J_1 = 3.7$ Hz, $J_2 = 7.4$ Hz, 1H, H-3).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 19.52 (-CH₃), 20.18 (-CH₃), 20.61 (-CH₃), 55.03 (OCH₃), 63.02 (C-5), 69.41, 70.35 (C-2, C-3), 78.97 (C-4), 101.15 (C-1), 169.29 (CO), 169.82 (CO), 169.95 (CO).

Metil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (2):



Mr: 290

Rf: 0.48 en Hexano/AcOEt 1:1

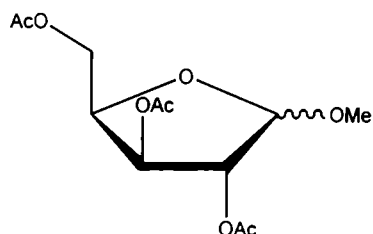
Rendimiento: 53%

($\alpha:\beta$ 2:1)*

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz) ($\alpha:\beta$ 2:1): δ 2.09 (s, 3H, -CH₃- α), 2.10 (s, 3H, -CH₃ α), 2.11 (s, 1.5H, -CH₃ β), 2.12 (s, 1.5H, -CH₃ β), 2.13 (s, 1.5H, -CH₃ β), 2.18 (s, 3H, -CH₃ α), 3.38 (s, 3H, -CH₃ α), 3.40 (s, 1.5H, -CH₃ β), 4.09-4.14 (m, 0.5 H, H-5 β), 4.15-4.19 (m, 0.5 H, H-5 β), 4.21-4.26 (m, 2 H, H-5 α), 4.38-4.43 (m, 1.5 H, H-4- α,β), 4.94 (s, 1 H, H-1 α), 4.99 (dd, $J_1 = 1.4$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, 1 H, H-3 α), 5.03 (d, $J = 1.4$ Hz, 1 H, H-2 α), 5.05 (dd, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, 0.5 H, H-2 β), 5.10 (d, $J = 4.5$ Hz, 0.5 H, H-1 β), 5.32 (dd, $J_1 = 4.9$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, 0.5 H, H-3 β).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 19.68 (-CH₃), 19.85 (-CH₃), 19.88 (-CH₃), 19.90 (-CH₃), 20.02 (-CH₃), 53.56 (OCH₃ α), 54.08 (OCH₃ β), 62.28 (C-5 α), 64.19 (C-5 β), 74.89 (C-3 β), 75.93 (C-2 β), 76.41 (C-3 α), 77.66 (C-4 β), 79.48 (C-2 α), 80.39 (C-4 α), 100.19 (C-1 β), 105.85 (C-1 α), 169.23 (CO), 169.75 (CO), 169.82 (CO), 170.14 (CO), 170.19 (CO).

*La relación de anómeros se calculó por medio de las integraciones de las señales correspondientes al H-1 en el espectro de RMN ^1H

Metil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-xilofuranósido (3):

Mr: 290

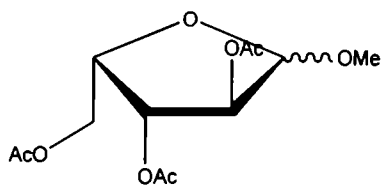
Rf: 0.57 en Hexano/AcOEt 1:1.

Rendimiento: 45 %

 $(\alpha:\beta$ 1:1)

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.95 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.96 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$), 1.91 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.98 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.99 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.21 (sa, 6 H, OCH_3), 4.00 (dd, $J_1 = 4.3$ Hz, $J_2 = 11.9$ Hz, 1 H, H-5 α), 4.07-4.15 (m, 3H, H-5 α,β), 4.34-4.37 (m, 1 H, H-4 α), 4.45-4.49 (m, 1 H, H-4 β), 4.76 (s, 1 H, H-1 β), 4.88 (dd, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 6.3$ Hz, 1 H, H-2 α), 4.95 (sa, 1 H, H-2 β) no se vê el J 1,4?, 5.02 (d, $J_1 = 4.5$ Hz, 1 H, H-1 α), 5.22 (dd, $J_1 = 1.4$ Hz, $J_2 = 6.1$ Hz, 1 H, H-3 β), 5.39 (t, $J_1 = 6.32$ Hz, 1 H, H-3 α).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.48($-\text{CH}_3$), 20.51($-\text{CH}_3$), 20.53 ($-\text{CH}_3$), 20.60 ($-\text{CH}_3$), 20.67 ($-\text{CH}_3$), 20.72 ($-\text{CH}_3$), 55.29 ($\text{OCH}_{3\beta}$), 55.45 ($\text{OCH}_{3\alpha}$), 61.76 (C-5 α), 63.01 (C-5 β), 73.28(C-3 α), 74.56(C-2 α), 74.84(C-3 β), 76.02(C-4 α), 78.03(C-2 β), 80.70 (C-4 β), 99.80 (C-1 α), 106.95 (C-1 β), 169.36 (CO), 169.70 (CO), 170.10 (CO), 170.13 (CO), 171.35 (CO), 170.43 (CO)

Metil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -L-arabinofuranósido (4):

Mr: 290

Rf: 0.48 en Hexano/AcOEt 1:1.

Rendimiento: 54 %

 $(\alpha:\beta$ 2:1).

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz) ($\alpha:\beta$ 2:1): δ 2.03 (s, 1.5 H, $-\text{CH}_3\beta$), 2.04 (s, 1.5 H, $-\text{CH}_3\beta$), 2.05 (s, 3 H, $-\text{CH}_3\alpha$), 2.06 (s, 1.5 H, $-\text{CH}_3\beta$), 2.07 (s, 3H, $\text{CH}_3\alpha$), 2.08 (s, 3H, $-\text{CH}_3\alpha$), 3.33 (s, 1.5 H, $\text{CH}_3\beta$), 3.35 (s, 3 H, $\text{CH}_3\alpha$), 4.04-4.19 (m, 3 H, H-5 α,β), 4.33-4.38 (m, 1.5 H, H-4 α,β), 4.90 (s, 1 H, H-1 α), 4.97 (dd, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, 1 H, H-3 α), 5.03 (dd, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 6.7$ Hz, 0.5 H, H-2 β), 5.04 (sa, 1 H, H-2 α), 5.04 (d, $J = 4.5$ Hz, 0.5 H, H-1 β), 5.32 (dd, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 6.7$ Hz, 0.5 H, H-3 β).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 19.11 ($-\text{CH}_3$), 19.27 ($-\text{CH}_3$), 19.30 ($-\text{CH}_3$), 19.31 ($-\text{CH}_3$), 19.33 ($-\text{CH}_3$), 53.48 ($\text{OCH}_3\text{-}\alpha$), 54.01 ($\text{OCH}_3\text{-}\beta$), 62.24 (C-5 α), 64.14 (C-5 β), 74.86 (C-3 β), 75.90

(C-2 β), 76.38 (C-3 α), 77.62 (C-4 β), 79.46 (C-2 α), 80.36 (C-4 α), 100.16 (C-1 β), 105.82 (C-1 α), 168.46 (CO), 168.49 (CO), 168.56 (CO), 168.60 (CO), 168.88 (CO), 168.92 (CO).

2.3.1.2- Síntesis de butil 2,3,5-tri-O-acetil-D/L-pentofuranósidos

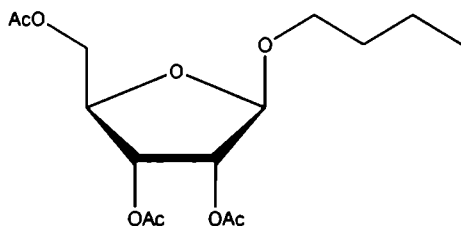
Procedimiento general para la síntesis de butil 2,3,5-tri-O-acetil-D-pentofuranósidos

La síntesis de los butil 2,3,5-tri-O-acetil-D-pentofuranósidos es análoga a la síntesis de metil 2,3,5-tri-O-acetil-D/L-pentofuranósidos (2.3.1.1), utilizando en este caso butanol en lugar de metanol.

De esta forma se obtuvieron los siguientes compuestos:

Butil 2,3,5-Tri-O-acetil- α,β -D-ribofuranósido (5a,5b):

Anomero β (5b)



Mr: 332

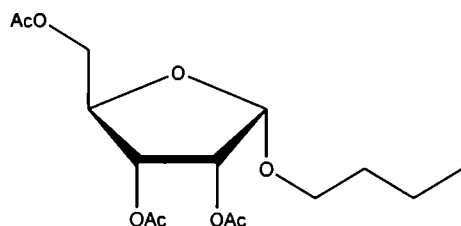
Rf: 0.54 en Hexano/AcOEt 3:1.

Rendimiento: 47 %

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ : 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3(\text{But})$), 1.28-1.36 (m, 2H, $-\text{CH}_2(\text{But})$), 1.48-1.52 (m, 2H, $-\text{CH}_2(\text{But})$), 2.02 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.06 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.08 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.33-3.38 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{But})$), 3.66-3.70 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{But})$), 4.07 (dd, $J_1 = 5.9$ Hz, $J_2 = 11.4$ Hz, 1H, H-5'), 4.23-4.27 (m, 1H, H-4), 4.26 (dd, $J_1 = 3.8$ Hz, $J_2 = 11.4$ Hz, 1H, H-5), 4.95 (d, $J_1 = 0.7$ Hz, 1H, H-1), 5.19 (dd, $J_1 = 0.7$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, 1H, H-2), 5.29 (dd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz, 1H, H-3).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 13.81 ($-\text{CH}_3(\text{But})$), 19.24 ($-\text{CH}_2(\text{But})$), 20.54 ($-\text{CH}_3$), 20.62 ($-\text{CH}_3$), 20.79 ($-\text{CH}_3$), 31.48 ($\text{CH}_2(\text{But})$), 64.82 (C-5), 68.03 ($\text{OCH}_2(\text{But})$), 71.70 (C-2), 74.81 (C-3), 78.27 (C-4), 105.25 (C-1), 169.59 (CO), 169.71 (CO), 170.55 (CO).

Anomero α (5a)



Mr: 332

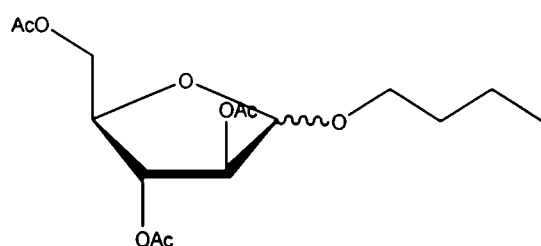
Rf: 0.46 en Hexano/AcOEt 3:1.

Rendimiento: 16 %

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ : 0.86 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3(\text{But})$), 1.27-1.34 (m, 2H, $-\text{CH}_2(\text{But})$), 1.49-1.53 (m, 2H, $-\text{CH}_2(\text{But})$), 2.04 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.05 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.06 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.41-3.45 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{But})$), 3.65-3.70 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{But})$), 4.14 (dd, $J_1 = 4.2$ Hz, $J_2 = 11.9$ Hz, 1H, H-5'), 4.20-4.22 (m, 1H, H-4), 4.29 (dd, $J_1 = 3.0$ Hz, $J_2 = 11.9$ Hz, 1H, H-5), 4.90 (dd, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, 1H, H-2), 5.09 (dd, $J_1 = 4.2$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, 1H, H-3), 5.18 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-1).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 13.77 ($-\text{CH}_3(\text{But})$), 19.45 ($-\text{CH}_2(\text{But})$), 20.51 ($-\text{CH}_3$), 20.70 ($-\text{CH}_3$), 20.77 ($-\text{CH}_3$), 31.48 ($\text{CH}_2(\text{But})$), 63.44 (C-5), 68.25 ($\text{OCH}_2(\text{But})$), 69.68, 70.76 (C-2, C-3), 78.76 (C-4), 100.43 (C-1), 169.93 (CO), 170.41 (CO), 170.59 (CO).

Butil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (6):



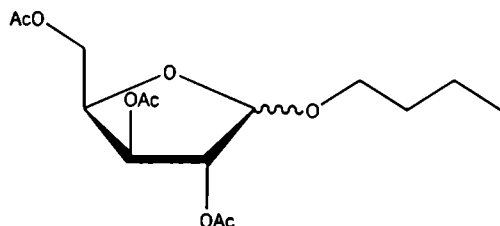
Mr: 332

Rf: 0.43 en Hexano/AcOEt 3:1.

Rendimiento: 56 % ($\alpha:\beta$ 5:1)

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz) ($\alpha:\beta$ 5:1): δ 0.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 0.6 H, $-\text{CH}_3(\text{But})\beta$) 0.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3(\text{But})\alpha$), 1.25-1.36 (m, 2.4 H, $-\text{CH}_2(\text{But})\alpha,\beta$), 1.46-1.55 (m, 2.4 H, $-\text{CH}_2(\text{But})\alpha,\beta$), 2.02 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.04 (s, 3.6 H, $-\text{CH}_3$), 2.04 (s, 3.6H, $-\text{CH}_3$), 3.36-3.44 (m, 1.2 H, $\text{OCH}_2(\text{But})\alpha,\beta$), 3.61-3.59 (m, 1.2 H, $\text{OCH}_2(\text{But})\alpha,\beta$), 4.12 (dd, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 11.4$ Hz, 0.2 H, H-5 β), 4.14-4.19 (m, 2.2 H, H-5 α , H-4 α,β), 4.34 (dd, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 11.4$ Hz, 0.2 H, H-5 β), 4.36 (dd, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 14.0$ Hz, 1 H, H-5 α), 4.90-4.92 (m, 1 H, H-3 α), 4.93 (dd, $J = 4.5$, $J = 6.6$ Hz, 0.2 H, H-2 β), 4.96 (s, 1 H, H-1 α), 5.01 (dd, $J_1 = 0.4$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, 1 H, H-2 α), 5.20 (d, $J = 4.5$ Hz, 0.2 H, H-1 β), 5.28 (dd, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 6.6$ Hz, 0.2 H, H-3 β).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 13.69 ($-\text{CH}_3(\text{But})$), 13.74 ($-\text{CH}_3(\text{But})$), 19.11 ($-\text{CH}_2(\text{But})$), 19.17 ($-\text{CH}_2(\text{But})$), 20.47 ($-\text{CH}_3$), 20.66 ($-\text{CH}_3$), 20.71 ($-\text{CH}_3$), 20.73 ($-\text{CH}_3$), 20.88 ($-\text{CH}_3$), 31.33 ($\text{CH}_2(\text{But})$), 31.37 ($\text{CH}_2(\text{But})$), 60.25 (C-5 α), 63.32 (C-5 β), 67.25 ($\text{OCH}_2(\text{But})$), 69.16 ($\text{OCH}_2(\text{But})$), 76.04 (C-3 β), 77.04 (C-2 β), 77.21 (C-2 α), 78.58 (C-4 β), 80.12 (C-2 α), 81.29 (C-4 α), 100.60 (C-1 β), 105.51 (C-1 α), 169.60 (CO), 170.01 (CO), 170.02 (CO), 170.30 (CO), 170.33 (CO), 170.05 (CO).

Butil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-xilofuranósido (7):

Mr: 332

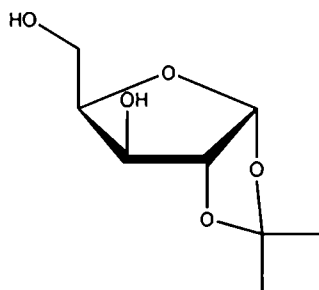
Rf: 0.64 en Hexano/AcOEt 3:1.

Rendimiento: 40 %

(α : β 1:1.3).

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 0.84 (m, 6.9 H, $-\text{CH}_3(\text{But})$), 1.35-1.23 (m, 4.6 H, $-\text{CH}_2(\text{But})$), 1.51-1.43 (m, 4.6 H, $-\text{CH}_2(\text{But})$), 2.00 (s, 3.9 H, $-\text{CH}_3$), 2.01 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.02 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.02 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3.9 H, $-\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3.9H, $-\text{CH}_3$), 3.31-3.37 (m, 2.3 H, $\text{CH}_2(\text{But})$), 3.62-3.68 (m, 2.3 H, $\text{CH}_2(\text{But})$), 4.05 (dd, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 1 H, H-5 α), 4.21-4.12 (m, 3.6 H, H-5 α,β), 4.39-4.42 (m, 1H, H-4 α), 4.48-4.52 (m, 1.3 H, H-4 β), 4.88 (dd, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 5.8$ Hz, 1H, H-2 α), 4.89 (s, 1.3 H, H-1 β), 5.02 (d, $J_1 = 1.5$ Hz, 1.3 H, H-2 β), 5.19 (d, $J_1 = 4.5$ Hz, 1H, H-1 α), 5.25 (dd, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz, 1.3 H, H-3 β), 5.46 (t, $J_1 = 6.1$ Hz, 1H, H-3 α).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 13.59 ($-\text{CH}_3(\text{But})$), 13.77 ($-\text{CH}_3(\text{But})$), 19.11 ($-\text{CH}_2(\text{But})$), 19.18 ($-\text{CH}_2(\text{But})$), 20.48 ($-\text{CH}_3$), 20.58 ($-\text{CH}_3$), 20.60 ($-\text{CH}_3$), 20.71 ($-\text{CH}_3$), 20.75 ($-\text{CH}_3$), 20.79 ($-\text{CH}_3$), 30.97($\text{CH}_2(\text{But})$), 31.43 ($\text{CH}_2(\text{But})$), 61.88 (C-5 β), 63.19 (C-5 α), 67.81, 68.27($-\text{OCH}_2(\text{But})\alpha,\beta$), 73.27, 74.81, 76.61 (C-2 α , C-3 α , C-4 α), 77.94, 79.46, 80.73(C-2 β , C-3 β , C-4 β), 98.98 (C-1 α), 105.85 (C-1 β), 169.42 (CO), 169.76 (CO), 170.17 (CO), 171.21 (CO), 170.43 (CO), 170.51 (CO).

2.3.1.3- Síntesis de 3,5-di-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (8):

Mr: 190

Rf: 0.44 en AcOEt

Rendimiento: 63 %

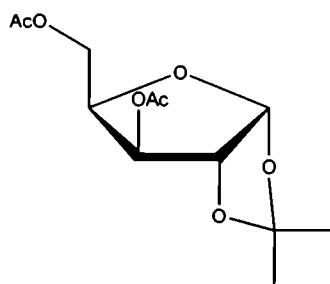
Se añadió a una solución de 1 g de xilosa (6.66 mmol) en 20 ml de acetona previamente destilada, 0.2 ml de H_2SO_4 (c) y CuSO_4 anh. (2 g, 0.0127 mmol). Esta solución se agitó a temperatura ambiente por 48 h. La reacción se siguió por c.c.d., y se mantuvo la agitación hasta desaparición del material de partida. Luego, la mezcla de reacción fue

neutralizada con 1 ml de NaOH 1 M y 0.4 g de NaHCO₃. Las sales insolubles fueron removidas por filtración y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida a un aceite obteniéndose, de esta forma, la 1,2;3,5-di-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa. Posteriormente se disolvió el crudo de reacción en MeOH y se añadió 8 ml de una solución acuosa de HCl 2 % v/v. Esta solución se mantuvo bajo agitación por 24 h a temperatura ambiente. Una vez concluida la reacción (c.c.d), se neutralizó la solución con TEA y se evaporó a presión reducida. El compuesto (**8**) se purificó en una columna de sílica gel, obteniéndose la xilosa protegida, con un 63 % de rendimiento (0.8 g)

Espectro de ¹H RMN (MeOD, 500 MHz): δ 1.31 (s, 3H, -CH₃(iPr)), 1.47 (s, 3H, CH₃(iPr)), 3.77 (dd, J₁ = 6.2 Hz, J₂ = 11.5 Hz, 1H, H-5), 3.82 (dd, J₁ = 4.8 Hz, J₂ = 11.5 Hz, 1H, H-5), 4.15-4.19 (m, 2H, H-4,3), 4.47 (d, J₁ = 3.6 Hz, 1H, H-1), 5.89 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-2).

Espectro de ¹³C RMN (MeOD, 125 MHz): δ 25.48 (-CH₃ (iPr)), 27.06 (-CH₃(iPr)), 60.83 (C-5), 75.57, 82.13, 86.56 (C-2, C-3, C-4), 105.96 (C-1), 112.48 (C(iPr)).

3,5-di-*O*-acetil-1,2-*O*-Isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**9**):



Mr: 274

Rf: 0.47 en Hexano: AcOEt 1:1

Rendimiento: 87 %

La 1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (0.8 g, 4.2 mmol) se disolvió en Py. anh. (30ml). Luego, se agregó a la solución, anhídrido acético previamente destilado (4.4 ml, 33 mmol) y cantidades catalíticas de DMAP. La mezcla se dejó a temperatura ambiente con agitación toda la noche y fue, posteriormente concentrada bajo presión reducida a sequedad.

El compuesto **9** se purificó por cromatografía en columna de sílica gel, obteniéndose la xilosa diacetilada, con un 87 % de rendimiento (1 g).

Espectro de ¹H RMN (Cl₃CD, 500 MHz): δ 1.08 (s, 3H, -CH₃(iPr)), 1.27 (s, 3H, CH₃(iPr)), 1.82 (s, 3H, -CH₃), 1.86 (s, 3H, -CH₃), 3.92 (dd, J₁ = 7.1 Hz, J₂ = 11.6 Hz, 1H, H-5), 4.04 (dd, J₁ = 5.0 Hz, J₂ = 11.6 Hz, 1H, H-5), 4.20-4.23 (m, 1H, H-4), 4.30 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-1), 5.00 (d, J = 3.1 Hz, 1H, H-3), 5.70 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-2).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 19.85 (-CH₃ (AcO)), 19.93 (-CH₃ (AcO)), 25.50 (-CH₃ (iPr)), 25.98 (-CH₃(iPr)), 60.68 (C-5), 75.43 (C-3), 76.12 (C-2), 82.74(C-4), 104.28 (C-1), 111.42 (C(iPr)), 168.84 (CO), 169.68 (CO).

2.3.2- Síntesis quimioenzimática de furanosas diacetiladas – reacciones enzimáticas de desacetilación

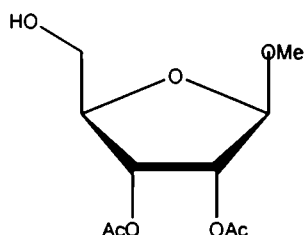
2.3.2.1- Reacciones de desacetilación enzimática utilizando la enzima CRL como biocatalizador

Procedimiento general para la desacetilación enzimática utilizando CRL

Una solución del furanósido acetilado (1 g) en DMF (11 ml) se mezcló con buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 7 (110 ml) y luego se añadió la CRL a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó a 37 °C con agitación orbital de 200 rpm y la reacción se siguió por c.c.d, hasta conversión máxima. La mezcla de reacción se extrajo con AcOEt (3x130ml). Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo resultante fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel.

De esta forma se obtuvieron los siguientes compuestos:

Metil 2,3-di-O-acetil-β-D-ribofuranósido (10b)



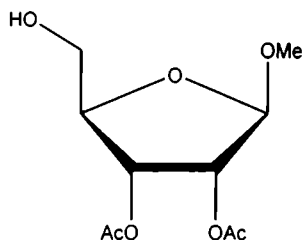
Mr: 248

Rf: 0.24 en Hexano/AcOEt 1:1

Rendimiento: 75%

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.87 (s, 3H, -CH₃), 1.92 (s, 3H, -CH₃), 3.23 (s, 3H, -CH₃), 3.46 (dd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 11.9$ Hz, 1H, H-5'), 3.57 (dd, $J_1 = 3.6$ Hz, $J_2 = 11.9$ Hz, 1H, H-5), 4.00-4.12 (m, 1H, H-4), 4.73 (d, $J_1 = 1.4$ Hz, 1H, H-1), 5.02 (dd, $J_1 = 1.4$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, 1H, H-2), 5.12 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, H-3).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.00 (-CH₃), 54.99 (OCH₃), 62.52 (C-5), 71.01 (C-2), 74.54 (C-3), 81.59 (C-4), 105.84 (C-1), 169.28 (CO), 169.56 (CO).

Metil 2,3-di-O-acetil- α -D-ribofuranósido (10a):

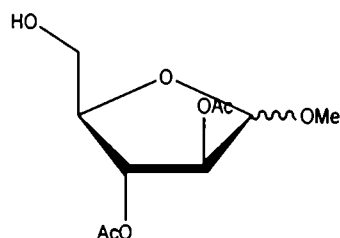
Mr: 248

Rf: 0.25 en Hexano: AcOEt 6:4

Rendimiento: 80 %

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 2.15 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.15 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.46 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.82 (dd, $J_1 = 3.3$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 1H, H-5'), 3.87 (dd, $J_1 = 3.2$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 1H, H-5), 4.15 (m, 1H, H-4), 4.97 (dd, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 7.4$ Hz, 1H, H-2), 5.15 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-1), 5.21 (dd, $J_1 = 3.5$ Hz, $J_2 = 7.4$ Hz, 1H, H-3).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.62($-\text{CH}_3$), 20.93($-\text{CH}_3$), 55.59 (OCH_3), 62.33 (C-5), 70.02 (C-2), 71.22 (C-3), 82.40 (C-4), 101.62 (C-1), 170.01 (CO), 170.82(CO).

Metil 2,3-di-O-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (11):

Mr: 248

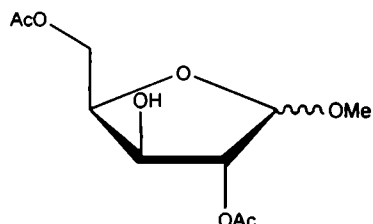
Rf: 0.21 en Hexano/AcOEt 1:1

Rendimiento: 70%

 $(\alpha:\beta$ 2:1)

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz) ($\alpha:\beta$ 2:1): δ 2.10 (s, 3 H, $-\text{CH}_3\alpha$), 2.10 (s, 1.5H, $-\text{CH}_3\beta$), 2.11 (s, 3 H, $-\text{CH}_3\alpha$), 2.12 (s, 1.5 H, $-\text{CH}_3\beta$), 3.40 (s, 3H, $-\text{CH}_3\alpha$), 3.41 (s, 1.5 H, $-\text{CH}_3\beta$), 3.77-3.82 (m, 2 H, H-5 α,β), 3.90 (dd, $J_1 = 4.1$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 1 H, H-5 α), 4.03 (q, $J = 4.8$ Hz, 0.5 H, H-4 β), 4.09-4.12 (m, 1 H, H-4 α), 4.92 (s, 1 H, H-1 α), 4.03 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz, 1 H, H-3 α), 5.07 (dd, $J_1 = 4.6$ Hz, $J_2 = 6.6$ Hz, 0.5 H, H-2 β), 5.09 (d, $J = 1.6$ Hz, 1 H, H-2 α), 5.11 (d, $J = 4.6$ Hz, 0.5 H, H-1 β), 5.34 (dd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 6.6$ Hz, 0.5 H, H-3 β).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.00 ($-\text{CH}_3$), 54.69 ($\text{OCH}_3\beta$), 55.67 ($\text{OCH}_3\alpha$), 61.84 (C-5 β), 63.98 (C-5 α), 76.99 (C-2 α), 77.06 (C-2 β), 77.16 (C-3 α), 81.55 (C-3 β), 82.09 (C-4 α), 82.81 (C-4 β), 100.74 (C-1 α), 106.49 (C-1 β), 169.28 (CO), 169.56 (CO).

Metil 2,5-di-O-acetil- α,β -D-xilofuranósido (12):

Mr: 248

Rf: 0.35 en Hexano: AcOEt 1:1

Rendimiento: 54 %

 $(\alpha:\beta$ 3:2)

La desacetilación del metil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-xilofuranósido, utilizando CRL como biocatalizador, dio el metil 2,5-di-O-acetil- α,β -D-xilofuranósidos como mezcla anomérica, con un rendimiento de 54 %. ($\alpha:\beta$ 3:2). En este caso se pudieron separar cromatográficamente pequeñas fracciones de los anómeros puros, para así facilitar la asignación espectroscópica, que se presentará por separado.

Anómero β

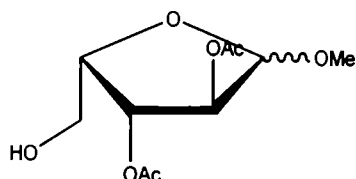
Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 2.06 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.08 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.40 (s, 3H, OCH_3), 4.18 (m, 1H, H-3), 4.23 (dd, $J_1 = 6.9$ Hz, $J_2 = 11.4$ Hz, 1H, H-5), 4.38-4.41 (m, 1H, H-4), 4.44 (dd, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 11.4$ Hz, 1H, H-5), 4.91 (s, 1H, H-1), 4.99 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H-2).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.72 ($-\text{CH}_3$), 20.91 ($-\text{CH}_3$), 55.45 (OCH_3), 63.68 (C-5), 74.25 (C-3), 80.93, 81.97 (C-2,C-4), 106.49 (C-1), 169.88 (CO), 170.86 (CO)

Anómero α

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 2.08 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.12 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.38 (s, 3H, OCH_3), 4.17 (dd, $J_1 = 5.8$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 1H, H-5), 4.30-4.33 (m, 1H, H-4), 4.45 (dd, $J_1 = 4.1$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 1H, H-5), 4.48 (dd, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 6.6$ Hz, 1H, H-3), 4.85 (dd, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H-2), 5.07 (d, $J_1 = 4.4$ Hz, 1H, H-1)

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.72 ($-\text{CH}_3$), 20.95 ($-\text{CH}_3$), 55.61 (OCH_3), 62.86 (C-5), 73.73 (C-3), 75.57 (C-2), 80.72 (C-4), 100.41 (C-1), 171.17 (CO), 171.45 (CO)

Metil 2,3-di-O-acetil- α,β -L-arabinofuranósido (13):

Mr: 248

Rf: 0.20 en Hexano: AcOEt 6:4

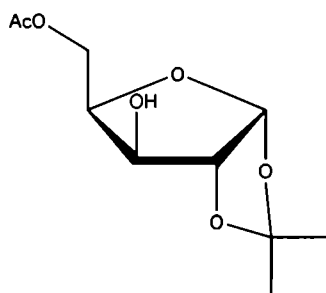
Rendimiento: 50 %

 $(\alpha:\beta$ 5:1)

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz) ($\alpha:\beta$ 5:1): δ 2.06 (s, 3 H, $-\text{CH}_3\alpha$), 2.07 (s, 0.6 H, $-\text{CH}_3\beta$), 2.07 (s, 3 H, $\text{CH}_3\alpha$), 2.08 (s, 0.6 H, $-\text{CH}_3\beta$), 3.37 (s, 3 H, $\text{CH}_3\alpha$), 3.38 (s, 0.6 H, $\text{CH}_3\beta$), 3.70 (dd, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=11.8$ Hz, 0.2 H, H-5 β) 3.75-3.79 (m, 1.2 H, H-5 α,β), 3.85 (dd, $J_1=3.5$ Hz, $J_2=12.0$ Hz, 1 H, H-5 α), 3.99-4.00 (m, 0.2 H, H-4 β), 4.05-4.09 (m, 1 H, H-4 α), 4.88 (s, 1 H, H-1 α), 4.99 (dd, $J_1=0.6$ Hz, $J_2=1.7$ Hz, $J_3=5.3$ Hz, 1 H, H-3 α), 5.03 (dd, $J_1=4.6$ Hz, $J_2=6.6$ Hz, 0.2 H, H-2 β), 5.06 (dd, $J_1=0.4$ Hz, $J_2=1.7$ Hz, 1 H, H-2 α), 5.08 (d, $J=4.6$ Hz, 0.2 H, H-1 β), 5.31 (dd, $J_1=4.8$ Hz, $J_2=6.6$ Hz, 0.2 H, H-3 β).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.41 ($-\text{CH}_3$), 20.57 ($-\text{CH}_3$), 20.63 ($-\text{CH}_3$), 20.65 ($-\text{CH}_3$), 54.65 ($\text{OCH}_3\alpha$), 55.58 ($\text{OCH}_3\beta$), 61.76 (C-5 α), 64.02 (C-5 β), 75.77 (C-3 β), 77.02 (C-3 α), 77.10 (C-2 β), 81.62 (C-2 α), 81.98 (C-4 β), 82.83 (C-4 α), 100.79 (C-1 β), 106.51 (C-1 α), 169.73 (CO), 170.25 (CO), 170.44 (CO), 170.75 (CO).

5-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (26):



Mr: 232

Rf: 0.33 en Hexano: AcOEt 1:1

Rendimiento: 95 %

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.33 (s, 3H, $-\text{CH}_3(\text{iPr})$), 1.51 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{iPr})$), 2.12 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 4.14 (sa, 1H, H-3), 4.18 (dd, $J_1=5.4$ Hz, $J_2=11.5$ Hz, 1H, H-5), 4.28-4.25 (m, 1H, H-4), 4.51 (dd, $J_1=7.0$ Hz, $J_2=11.5$ Hz, 1H, H-5), 4.56 (d, $J=3.6$ Hz, 1H, H-1), 5.93 (d, $J=3.6$ Hz, 1H, H-2).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.87 ($-\text{CH}_3(\text{AcO})$), 26.17 ($-\text{CH}_3(\text{iPr})$), 26.78 ($-\text{CH}_3(\text{iPr})$), 61.22 (C-5), 74.52 (C-3), 78.29 (C-2), 85.06 (C-4), 104.74 (C-1), 111.89 (C(iPr)), 171.94 (CO).

2.3.2.2- Reacciones de desacetilación enzimática utilizando tejido vegetal (*Musa sapientum*) como biocatalizador

Procedimiento general para la desacetilación enzimática utilizando tejido vegetal (trozos de banana)

Se cortaron cubos de banana ecuatoriana *Musa sapientum*, variedad Cavendish, con un coeficiente de maduración de aproximadamente 1.80,¹ accesible en comercios. Estos cubos de menos de 1 cm³, fueron lavados sucesivamente con una solución acuosa 1 % en NaClO, agua destilada, etanol, agua destilada nuevamente y una solución de buffer fosfato 100 mM, pH=7. Para la reacción de desacetilación, se tomaron 10 g de los cubos de banana pre tratados y se los resuspendió en 10 ml de buffer fosfato 100 mM (pH=7). Separadamente, el sustrato (0.3 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF o AcOEt, dependiendo del experimento. La reacción comenzó con el mezclado de la solución y la suspensión de banana, y la mezcla de reacción se agitó en un agitador recíproco (37°C, 200 rpm) hasta conversión máxima a producto. Una vez concluida la reacción, la mezcla fue centrifugada (5 min, 3000 rpm) y el sobrenadante se extrajo con AcOEt, se secó con Na₂SO₄(s) anhidro, y finalmente, se filtró y concentró por evaporación del solvente a presión reducida. Las mezclas crudas de reacción fueron estudiadas mediante análisis por RMN y luego se purificaron por cromatografía en columna de sílice gel utilizando mezclas de hexano: AcOEt como solvente de elución. Se realizaron, asimismo, experimentos de control de hidrólisis en ausencia de biocatalizadores, recuperando en todos los casos la cantidad inicial de producto acetilado.

De esta forma se obtuvieron los siguientes compuestos:

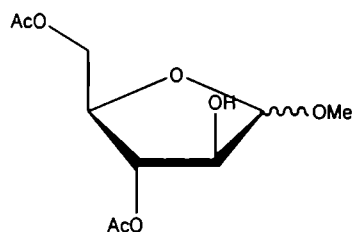
Metil 2,3-di-O-acetil- α -D-ribofuranósido (10a):

La desacetilación utilizando trozos de banana como biocatalizador, del metil 2,3,5-tri-O-acetil- α -D-ribofuranósido dio como único producto el metil 2,3-di-O-acetil- α -D-ribofuranósido, con un rendimiento de aproximadamente 99%. Las asignaciones espectrales son idénticas al producto 10a, obtenido por desacetilación enzimática utilizando la CRL.

¹ Bailey, M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1912, 36, 1706

Metil 2,3-di-O-acetil-β-D-ribofuranósido (10b), metil 2,5-di-O-acetil-β-D-ribofuranósido (14b), metil 3,5-di-O-acetil-β-D-ribofuranósido (15b):

La desacetilación utilizando trozos de banana como biocatalizador del metil 2,3,5-tri-O-acetil-β-D-ribofuranósido dio los tres posibles productos de desacetilación de forma equimolar, con un rendimiento global de 59%. Los productos obtenidos no pudieron separarse, obteniéndose como una mezcla luego de la purificación por cromatografía en columna.

Metil 3,5-di-O-acetil-α,β-D-arabinofuranósido (17a, 17b):

Mr: 248

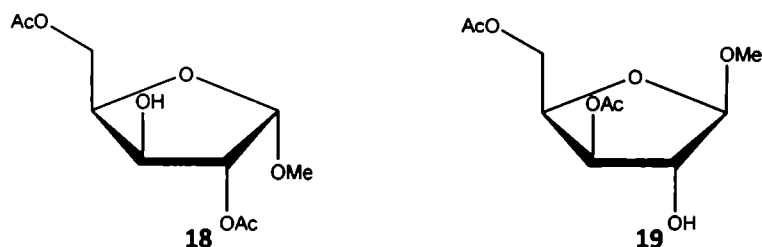
Rf: 0.22 en Hexano: AcOEt 1:1

Rendimiento: 30 %

La desacetilación utilizando trozos de banana como biocatalizador a conversiones bajas, del metil 2,3,5-tri-O-acetil-α,β-D-arabinofuranósido dio como producto mayoritario el metil 3,5-di-O-acetil-α,β-D-arabinofuranósido, con un rendimiento de aproximadamente 30%. A mayores conversiones se obtuvieron mezclas de este producto junto con varios productos monodesacetilados del anómero α.

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 2.09 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.10 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.11 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.12 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.40 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.47 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.09-4.12 (m, 1 H, H-4 α), 4.12 (sa, 1 H, H-2 α), 4.17 (dd, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 11.5$ Hz, 1H, H-5 β), 4.23-4.28 (m, 3 H, H-4,-2 β ,-5 α), 4.35 (dd, $J_1 = 4.0$ Hz, $J_2 = 11.4$ Hz, 1H, H-5 α), 4.37 (dd, $J_1 = 4.0$ Hz, $J_2 = 11.5$ Hz, 1H, H-5 β), 4.66 (dd, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 6.1$ Hz, 1H, H-3 α), 4.89 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H-1 β), 4.91 (s, 1 H, H-1 α), 5.05 (dd, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 6.2$ Hz, 1H, H-3 β).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.78 ($-\text{CH}_3$), 20.76 ($-\text{CH}_3$), 20.85 ($-\text{CH}_3$), 20.89 ($-\text{CH}_3$), 55.14 ($\text{OCH}_3\alpha$), 55.56 ($\text{OCH}_3\beta$), 63.32 (C-5 α), 65.43 (C-5 β), 76.57 (C-2 β), 78.92 (C-2 α), 79.28 (C-3 β), 79.41 (C-4 β), 81.05 (C-3 α), 81.22 (C-4 α), 102.40 (C-1 β), 108.95 (C-1 α), 170.63 (CO), 170.69 (CO), 170.95 (CO), 171.79 (CO).

Metil 3,5-di-O-acetil-β-D-xilofuranósido (19), Metil 2,5-di-O-acetil-α-D-xilofuranósido (18):

La desacetilación utilizando trozos de banana como biocatalizador del metil 2,3,5-tri-O-acetil-α,β-D-xilofuranósido produjo una mezcla de los siguientes productos: metil 3,5-di-O-acetil-β-D-xilofuranósido y metil 2,5-di-O-acetil-α-D-xilofuranósido, con un rendimiento global de aproximadamente 43%. (α:β 5.3:3.8). Se pudieron separar cromatográficamente pequeñas porciones de los isómeros puros, facilitándose de esta manera la asignación espectroscópica.

Metil 3,5-di-O-acetil-β-D-xilofuranósido (19):

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 2.08 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.10 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.40 (s, 3H, OCH_3), 4.16 (m, 1H, H-2), 4.20 (dd, $J_1 = 7.3$ Hz, $J_2 = 11.6$ Hz, 1H, H-5), 4.32 (dd, $J_1 = 4.7$ Hz, $J_2 = 11.6$ Hz, 1H, H-5), 4.57-4.61 (m, 1H, H-4), 4.87 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-1), 5.06 (dd, $J_1 = 2.3$ Hz, $J_2 = 6.2$ Hz, 1H, H-3),

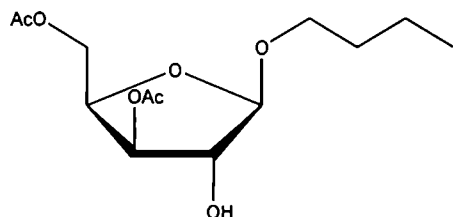
Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.71 ($-\text{CH}_3$), 20.78 ($-\text{CH}_3$), 55.53 (OCH_3), 63.33 (C-5), 77.34 (C-3), 78.78 (C-2), 80.11 (C-4), 109.20 (C-1), 170.75 (CO), 171.10 (CO)

Metil 3,5-di-O-acetil-β-D-xilofuranósido (18):

Las asignaciones espectrales del metil 2,5-di-O-acetil-α-D-xilofuranósido son idénticas al producto obtenido por desacetilación enzimática del metil 2,3,5-tri-O-acetil-D-xilofuranósido (anómero α, compuesto 12) utilizando la enzima comercial CRL.

Butil 3,5-di-O-acetil-β-D-xilofuranósido (22) y butil 2,5-di-O-acetil-α-D-xilofuranósido (21):

La desacetilación utilizando trozos de banana como biocatalizador del metil 2,3,5-tri-O-acetil-α,β-D-xilofuranósido dio una mezcla de los productos: butil 3,5-di-O-acetil-β-D-xilofuranósido y butil 2,5-di-O-acetil-α-D-xilofuranósido con un rendimiento global de 72%. Los isómeros no pudieron separarse completamente por métodos cromatográficos, obteniéndose el anómero β puro en gran proporción (32 %).

Butil 3,5-di-O-acetil-β-D-xilofuranósido (22):

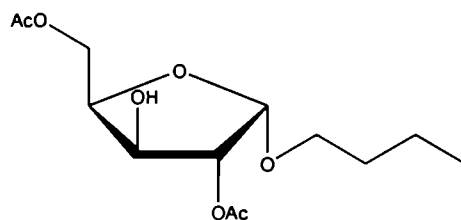
Mr: 290

Rf: 0.33 en Hexano: AcOEt 8:3

Rendimiento: 32 %

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 0.93 (t, $J = 7.25$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3(\text{But})$), 1.41-1.33 (m, 2H, $-\text{CH}_2(\text{But})$), 1.59-1.53 (m, 2H, $-\text{CH}_2(\text{But})$), 2.09 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.10 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.42 (dt, $J_1 = 6.6$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_2(\text{But})$), 3.73 (dt, $J_1 = 6.9$ Hz, $J_2 = 9.4$ Hz, 1H, $\text{CH}_2(\text{But})$), 4.17 (d, $J_1 = 2.18$ Hz, 1H, H-2), 4.20 (dd, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 11.5$ Hz, 1H, H-5), 4.32 (dd, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 11.5$ Hz, 1H, H-5), 4.59-3.56 (m, 1H, H-4), 4.91 (d, $J_1 = 1.4$ Hz, 1H, H-1), 5.05 (dd, $J_1 = 2.2$ Hz, $J_2 = 6.1$ Hz, 1H, H-3).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 13.47 ($-\text{CH}_3(\text{But})$), 19.11 ($-\text{CH}_2(\text{But})$), 20.67 ($-\text{CH}_3$), 20.77 ($-\text{CH}_3$), 31.54 ($\text{CH}_2(\text{But})$), 63.40 (C-5), 67.96 ($\text{OCH}_2(\text{But})$), 77.22 (C-3), 78.88 (C-2), 80.06 (C-4), 107.92 (C-1), 170.73 (CO), 171.14 (CO).

Butil 2,5-di-O-acetil-α-D-xilofuranósido (21):

Mr: 290

Rf: 0.28 en Hexano: AcOEt 8:3

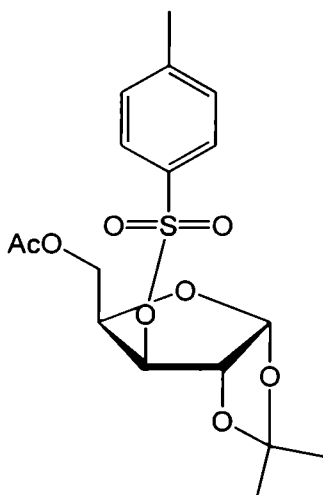
Rendimiento: 40 % (α y β)

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 0.89 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3(\text{But})$), 1.30-1.39 (m, 2H, $-\text{CH}_2(\text{But})$), 1.49-1.56 (m, 2H, $-\text{CH}_2(\text{But})$), 2.09 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.12 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.38-3.46 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{But})$), 3.69-3.73 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{But})$), 4.16 (dd, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 1H, H-5), 4.29-4.34 (m, 1H, H-3), 4.47 (dd, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 1H, H-5), 4.53-4.49 (m, 1H, H-4), 4.79 (dd, $J_1 = 4.7$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, 1H, H-2), 5.19 (d, $J_1 = 4.5$ Hz, 1H, H-1),

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 13.80 ($-\text{CH}_3(\text{But})$), 19.18 ($-\text{CH}_2(\text{But})$), 20.72 ($-\text{CH}_3$), 21.01 ($-\text{CH}_3$), 31.52 ($\text{CH}_2(\text{But})$), 62.86 (C-5), 68.93 ($\text{OCH}_2(\text{But})$), 73.80 (C-3), 75.43 (C-2), 80.72 (C-4), 99.45 (C-1), 171.16 (CO), 171.34 (CO)

5-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (26):

La desacetilación utilizando trozos de banana como biocatalizador, del 3,5-di-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa dio como único producto el 5-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa, con un rendimiento del 87%. Las asignaciones espectrales son idénticas al producto 26, obtenido por desacetilación enzimática utilizando la enzima comercial CRL. (8.3.2.1)

2.3.3- Síntesis del precursor del 3-amino-3-desoxi-D-ribofuranosa 5-fosfato y/o 3-azido-3-desoxi-D-ribofuranosa 5-fosfato5-O-acetil-1,2-O-isopropiliden-3-O-p-toluensulfonil- α -D-xilofuranosa (28a)

Mr: 386

Rf: 0.4 Hexano: AcOEt 8:3

Rendimiento: 69 %

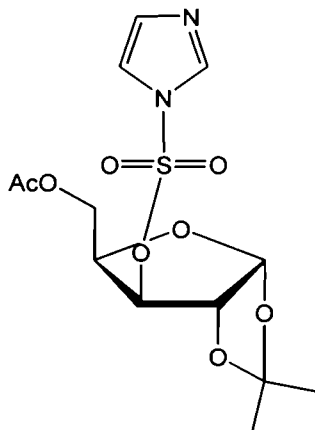
A una solución de 5-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (26, 0.49 g, 2.16 mmol) en 1 ml de THF anh., se añadió 0.08 ml de Py. (9.72 mmol) y 1.2 equivalentes de la base fuerte, BDDDP (0.07 g). Esta solución se enfrió a 0 °C y se añadió cloruro de p-toluensulfonilo (p-TsCl, 0.16 g, 8.64 mmol). La reacción se siguió por c.cd. Luego de 5 h de reacción, la solución se neutralizó mediante el agregado de 1 ml de HCl 5%. Finalmente, la mezcla de reacción neutralizada se disolvió en diclorometano (9 ml) y se extrajo secuencialmente como se cita a continuación: 5% HCl (3 x 10 ml), 5 % NaHCO₃ (3 x 10 ml) y agua destilada (3 x 10 ml). El extracto se secó con Na₂SO₄ (sólido) y evaporó a sequedad. El residuo resultante fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel (Hexano: AcOEt 8:3). Se obtuvo así, el producto 28a (0.57 g, 69% de rendimiento).

Espectro de ¹H RMN (Cl₃CD, 500 MHz): δ 1.31 (s, 3H, -CH₃(iPr)), 1.49 (s, 3H, CH₃(iPr)), 1.97 (s, 3H, -CH₃), 2.47 (s, 3H, CH₃(Bn)), 4.06 (dd, J₁ = 5.5 Hz, J₂ = 11.5 Hz, 1H, H-5), 4.15 (dd, J₁ = 6.8 Hz, J₂ = 11.5 Hz, 1H, H-5), 4.40-4.43 (m, 1H, H-4), 4.73 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-1), 4.86 (d, J = 2.7 Hz, 1H,

H-3), 5.95 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-2), 7.39 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, arom), 7.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, arom)

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.59 (-CH₃ (AcO)), 26.15 (-CH₃ (iPr)), 26.53 -CH₃(iPr), 60.92 (C-5), 76.46 (C-3), 81.49 (C-2), 83.10 (C-4), 104.81 (C-1), 112.53 (C(iPr)), 127.92, 130.07, 145.56 (aromat.), 170.24 (CO).

5-O-acetil-3-O-imidazoilsulfonil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (28b)



Mr:362

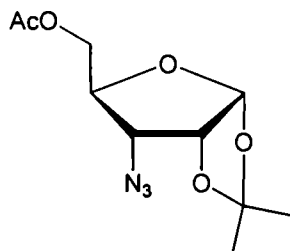
Rf: 0.33 Hexano: AcOEt 8:3

Rendimiento: 70 %

Se enfrió una solución de 5-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**26**, 0.275 g, 1.18 mmol) en 6 ml de CH_2Cl_2 y 0.17 ml de Py. (20.54 mmol) a -35 °C. Una vez alcanzada la temperatura se añadió SO_2Cl_2 (0.12 ml, 1.52 mmol), y se dejó avanzar la reacción por 0.5 hs. Luego se añadió 1H-imidazol (0.76 g, 10.60 mmol), y se elevó la temperatura de reacción a T. amb. La reacción se siguió por c.c.d., hasta desaparición del reactivo de partida (16 h). La mezcla de reacción se disolvió en diclorometano (10 ml) y se extrajo de NaHCO_3 y agua, secuencialmente. El extracto se secó con Na_2SO_4 y evaporó a sequedad. El residuo resultante fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel (Hexano: AcOEt 1:1). Se obtuvo así, el producto **28b** (0.30 g, 70 % de rendimiento).

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.24 (s, 3H, -CH₃(iPr)), 1.43 (s, 3H, CH₃(iPr)), 1.96 (s, 3H, -CH₃), 3.98 (dd, $J_1 = 6.8$ Hz, $J_2 = 11.4$ Hz, 1H, H-5), 4.24 (dd, $J_1 = 6.1$ Hz, $J_2 = 11.4$ Hz 1H, H-5), 4.38-4.41 (m, 1H, H-4), 4.49 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-1), 4.88 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-3), 5.91 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-2), 7.16 (sa, 1 H, arom), 7.35 (sa, 1 H, arom), 7.988(s, 1 H, arom).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.52 (-CH₃ (AcO)), 26.33 (-CH₃ (iPr)), 26.87 (-CH₃(iPr)), 59.73 (C-5), 75.87 (C-3), 82.28 (C-2), 85.66 (C-4), 104.62 (C-1), 112.97 (C(iPr)), 117.87, 131.70, 136.93 (aromat.), 170.09 (CO).

5-O-acetil-3-azido-3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-ribofuranosa (29)

Mr: 257

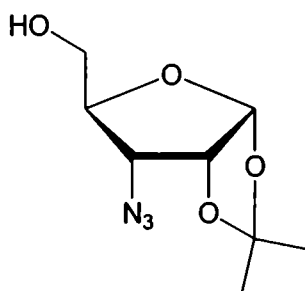
Rf: 0.6 Hexano: AcOEt 1:1

Rendimiento: 43 %

A una solución del 5-O-acetil-3-O-imidazoilsulfonil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (28b, 0.3g, 0.83 mmol) en DMF (18 ml), se agregaron 15 equiv. de azida sódica (0.80 g, 12.45 mmol), y se calentó a 70 °C por 3 días. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida, el residuo se disolvió en diclorometano (10 ml) y se extrajo con agua. El extracto se secó con Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad. El residuo resultante fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel, obteniéndose así, el producto 29 (0.095 g, 43% de rendimiento).

Espectro de ¹H RMN (Cl₃CD, 500 MHz): δ 1.29 (s, 3H, -CH₃(iPr)), 1.50 (s, 3H, CH₃(iPr)), 2.02 (s, 3H, -CH₃), 3.28 (dd, J₁ = 4.2 Hz, J₂ = 9.5 Hz, 1H, H-3), 3.98 (dd, J₁ = 4.9 Hz, J₂ = 12.0 Hz, 1H, H-5), 4.16-4.19 (m, 1H, H-4), 4.32 (dd, J₁ = 2.8 Hz, J₂ = 12.0 Hz, 1H, H-5), 4.67 (ta, J = 4.1 Hz, 1H, H-2), 5.74 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-1).

Espectro de ¹³C RMN (Cl₃CD, 125 MHz): δ 20.70 (-CH₃ (AcO)), 26.32 (-CH₃ (iPr)), 26.37 (-CH₃(iPr)), 61.19 (C-5), 62.48 (C-3), 75.48 (C-2), 79.87 (C-4), 104.16 (C-1), 113.29 (C(iPr)), 170.09 (CO).

3-Azido-3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-ribofuranosa (30)

Mr: 215

Rf: 0.48 Hexano: AcOEt 1:1

Rendimiento: 100 %

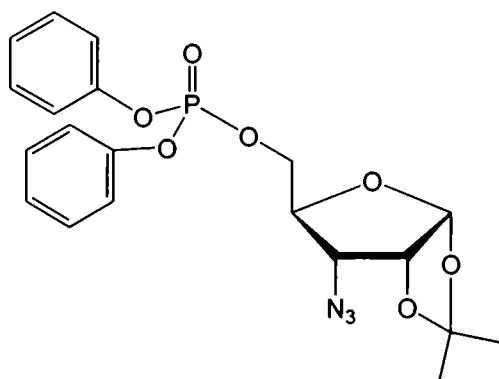
Se disolvió el 5-O-acetil-3-azido-3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-ribofuranosa (29, 0.095 g, 0.35 mmol) en 1.2 ml de MeOH, y se añadió a esta solución 0.06 g de K₂CO₃, agitándose la mezcla a temperatura ambiente por 8 h. hasta determinar su finalización por c.c.d. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida, se disolvió en diclorometano (10

ml) y se extrajo con agua. El extracto se secó con Na_2SO_4 y se evaporó a sequedad. El residuo resultante fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel (Hexano: AcOEt 1:1), obteniéndose así, el producto **30** (0.075 g, 100%).

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.31 (s, 3H, $-\text{CH}_3(\text{iPr})$), 1.51 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{iPr})$), 3.50 (dd, $J_1 = 4.2$ Hz, $J_2 = 9.7$ Hz, 1H, H-3), 3.64 (dd, $J_1 = 2.8$ Hz, $J_2 = 12.7$ Hz, 1H, H-5), 3.92 (dd, $J_1 = 2.2$ Hz, $J_2 = 12.7$ Hz, 1H, H-5), 4.05-4.08 (m, 1H, H-4), 4.69 (ta, $J = 4.1$ Hz, 1H, H-2), 5.75 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-1).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 26.32 ($-\text{CH}_3(\text{iPr})$), 26.54 ($-\text{CH}_3(\text{iPr})$), 59.35 (C-5), 60.10 (C-3), 78.18 (C-2), 80.13 (C-4), 104.60 (C-1), 113.20 (C(iPr)).

3-azido-3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-ribofuranosa 5-difenilfosfato (33)



Mr: 447

Rf: 0.78 Hexano: AcOEt 8:3

Rendimiento: 68 %

El compuesto **30** seco (0.075 g, 0.35 mmol) fue disuelto en diclorometano (1.5 ml) y TEA (0,1 ml, 0.70 mmol) y la solución se enfrió a -10 °C. A esta solución se le añadió, con agitación, el reactivo fosforilante difenil clorofosfato (0.18 ml, 1.23 mmol). Se agitó esta solución por 8 h a temperatura ambiente, hasta desaparición del sustrato. Luego se añadió a la solución, diclorometano (10 ml) y se extrajo secuencialmente como se cita a continuación: HCl 0.5 M (3 x 10 ml), NaHCO_3 5 % (3 x 10 ml) y agua destilada (3 x 20 ml). El extracto se secó con Na_2SO_4 y se evaporó a sequedad. El fosfato **33** fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel (Hexano: AcOEt 1:1), para así obtener el producto puro con un 68 % de rendimiento (0.11 g).

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.35 (s, 3H, $-\text{CH}_3(\text{iPr})$), 1.55 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{iPr})$), 3.49 (dd, $J_1 = 4.6$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz, 1H, H-3), 4.19 (dq, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz, 1H, H-4), 4.35 (ddd, $J_1 = 3.2$ Hz, $J_2 = 7.7$ Hz, $J_3 = 11.8$, 1H, H-5), 4.60 (ddd, $J_1 = 2.3$ Hz, $J_2 = 6.6$ Hz, $J_3 = 11.8$, 1H, H-5), 4.67 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, H-2), 5.70 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-1), 7.18-7.24 (m, 6 H, aromat.) , 7.33-7.36 (m, 4 H, aromat.)

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 26.36 ($-\text{CH}_3$ (iPr)), 26.41 ($-\text{CH}_3$ (iPr)), 59.85 (C-3), 66.01 (d, $J = 5.98$ Hz, C-5), 76.40 (d, $J = 7.40$ Hz, C-4), 79.80 (C-2), 104.10 (C-1), 113.55 (C(iPr)), 120.00 (d, $J = 4.92$ Hz), 120.05 (d, $J = 4.95$ Hz), 125.46, 129.77 (aromat.)

2.3.4- Síntesis de las furanosas 5-fosfato

2.3.4.1- Síntesis de ribosa 5-fosfato

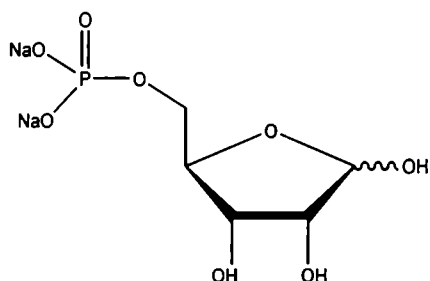
Metil 2,3,5-tri-O-acetil- β -D-ribofuranósido (1b)

La síntesis se encuentra descrita anteriormente en la sección de síntesis de metil 2,3,5-tri-O-acetil-D/L-pentofuranósidos (8.3.1.1), así como las asignaciones espectrales y los rendimientos correspondientes. Se utilizó solo el anomero β para así facilitar las posteriores asignaciones espectrales.

Metil 2,3-di-O-acetil- β -D-ribofuranósido (10b):

Las asignaciones espectrales así como el rendimiento de la reacción se describen anteriormente en la sección de síntesis quimioenzimática de furanosas diacetiladas – reacciones enzimáticas de desacetilación utilizando CRL (8.3.2.1)

α,β -D-ribosa 5-fosfato (sal disódica) (34):



Mr: 274

Rf: 0.3 NH_3 /isopropanol/ H_2O 9:9:2

Rendimiento: 63%

En un balón bajo atmósfera de N_2 se cargaron ACN (1.5 ml) y POCl_3 (0.4 ml 4.25 mmol), enfriándose la mezcla con un baño refrigerante de hielo/ NaCl (s), agregándose, luego, Py (0.23ml, 2.83 mmol) a la solución. Posteriormente, se adicionó gota a gota, una solución del compuesto metil 2,3-di-O-acetil- β -D-ribofuranósido 2a (0.70 g, 2.83 mmol) en ACN (1.5 ml) a la solución enfriada, a una velocidad tal que la temperatura de reacción no excediera los 0°C . La mezcla de reacción fue agitada por 2 hs a 0°C . Luego, la mezcla fue volcada sobre 11.5 ml de

agua destilada fría y calentada en un baño de agua a 70 °C por 1 h, para así, hidrolizar los grupos protectores. La solución fue enfriada en un baño de hielo, el pH se ajustó a 5 con NaOH 10 N, y fueron añadidos 3 ml de una solución saturada de BaCl₂. Los sólidos precipitados fueron separados por centrifugación y descartados (Ba₃(PO₄)₂). Se enfrió nuevamente el sobrenadante en un baño de hielo y el pH se ajustó a 7.5. Luego, se agregó lentamente etanol (1.5 volúmenes) a la solución con agitación. Se centrifugó y se recuperó el sólido precipitado. Éste se lavó con etanol. Se obtuvieron 0.79 g (2.16 mmol) de la sal de bario.

El sólido resultante, fue disuelto en 6 ml de agua destilada y pasado por una resina de intercambio iónico, Dowex X2-200 (H⁺), eluyendo con agua destilada. Las fracciones ácidas fueron recolectadas y neutralizadas con una solución 10 N de NaOH. El agua fue removida por liofilización para así obtener el producto **34** con un rendimiento del 63% (0.492 g).

Espectro de ¹H RMN (D₂O, 500 MHz): δ 3.80 (m, 3 H), 3.88 (m, 1.5 H), 4.03 (m, 2.5 H), 4.14 (m, 1 H), 4.18 (m, 0.5 H), 5.19 (m, 1H), 5.35 (m, 0.5 H).

Espectro de ¹³C RMN (Cl₃CD, 125 MHz): δ 64.62 (C-5), 65.48 (C-5), 71.15, 71.61, 76.22 (C-2,C-3), 82.68 (C-4), 82.79 (C-4), 97.07(C-1α), 102.01(C-1β).

Espectro de ³¹P NMR (Cl₃CD, 202.4 MHz): δ 4.34

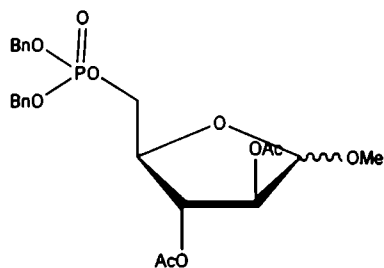
2.3.4.2- Síntesis de arabinosa 5-fosfato

Metil 2,3,5-tri-O-acetil-α,β-D-arabinofuranósido (2)

La síntesis se encuentra descrita anteriormente en la sección de síntesis de metil 2,3,5-tri-O-acetil-D/L-pentofuranósidos (8.3.1.1), así como las asignaciones espectrales y los rendimientos correspondientes.

Metil 2,3-di-O-acetil-α,β-D-arabinofuranósido (11):

Las asignaciones espectrales así como el rendimiento de la reacción se describen anteriormente en la sección de síntesis quimioenzimática de furanosas diacetiladas – reacciones enzimáticas de desacetilación utilizando CRL (2.3.2.1).

Metil 2,3-di-O-acetil- α,β -D-arabinofuranosa 5-dibencilfosfato (39):

Mr: 480

Rf: 0.51 en Hexano:AcOEt 1:1

Rendimiento: 79 %

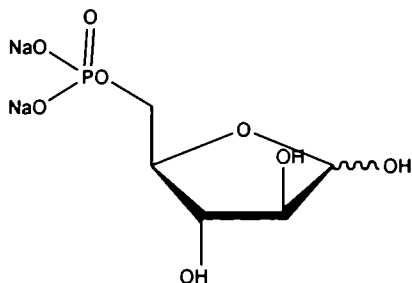
 $(\alpha:\beta$ 1:1)

El compuesto **11** seco (0.78 g, 3.15 mmol) fue disuelto bajo atmósfera de N_2 en THF anhidro (38 ml). A esta solución se le añadió, con agitación, 1H-tetrazol (1.97 g, 28.35 mmol) y se agitó hasta disolución del mismo. Luego, fue agregada la dibencil *N,N*-diisopropilfosforamidita (1.05 ml, 3.15 mmol) gota a gota y la mezcla fue agitada 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, para la oxidación de la fosforamidita, se enfrió la mezcla de reacción a -40 °C en un baño de hielo seco en acetona y se le añadió una solución del reactivo oxidante *tert*-butil hidroperóxido (TBHP) en decano (6M, 1.05 ml, 6.3 mmol). Se agitó esta solución por 2 horas a temperatura ambiente, hasta desaparición del sustrato. Finalmente, se detuvo la reacción con una solución 10 % de $NaHSO_3$ (6 ml), y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (20 ml) y se extrajo secuencialmente como se cita a continuación: 10% $NaHSO_3$ (3 x 20 ml), 5 % $NaHCO_3$ (3 x 20 ml) y agua destilada (3 x 20 ml). El extracto se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a sequedad. El fosfato bencilado fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel (Hexano:AcOEt 2:1), para así obtener el producto puro con un 79 % de rendimiento (**39**, 1.2 g).

Espectro de 1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): δ 2.01 (s, 3H, $-CH_3$), 2.04 (s, 3H, $-CH_3$), 2.05 (s, 3H, $-CH_3$), 2.07 (s, 3H, $-CH_3$), 3.32 (s, 3H, $-OCH_3$), 3.35 (s, 3H, $-OCH_3$), 4.12-4.33 (m, 6 H), 4.89 (m, 1 H), 4.99 (dd, $J_1=1.4$ Hz, $J_2=4.8$ Hz, 1 H), 5.03-5.09 (m, 11H), 5.28 (dd, $J=4.8$ Hz, $J=6.7$ Hz, 1 H), 7.32 (s, 20 H, aromat.).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.44 ($-CH_3$), 20.49 ($-CH_3$), 20.57 ($-CH_3$), 20.82 ($-CH_3$), 54.79 ($-OCH_3$), 55.32 ($-OCH_3$), 66.37 (d, $J=5.4$ Hz, C-5), 68.67 (d, $J=5.4$ Hz, $-CH_2(Bn)$), 69.31 (d, $J=5.4$ Hz, $-CH_2(Bn)$), 75.46, 76.76, 77.50, 80.92 (d, $J=7.2$ Hz, C-4), 81.21, 83.06 (d, $J=7.2$ Hz, C-4), 101.11(C-1 β), 106.69 (C-1 α), 127.85, 127.89, 128.48, 135.64, 135.74 (d, $J=7.2$ Hz) (aromat.), 169.61(CO), 169.80(CO), 170.01(CO), 170.08(CO).

Espectro de ^{31}P RMN (Cl_3CD , 202.4 MHz): δ -1.33.

α,β -D-arabinosa 5-fosfato (sal disódica) (40):

Mr: 274

Rf: 0.33NH₃/isopropanol/H₂O 9:9:2

Rendimiento: 68%

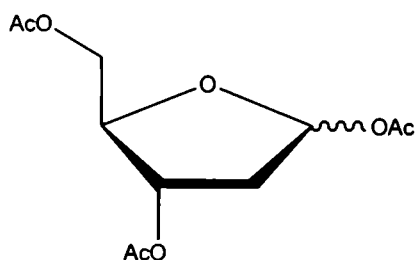
Una solución del compuesto **39** (1.2 g, 2.5 mmol) en 40 ml de AcOEt fue hidrogenada con 400 mg del catalizador, Pd(OH)₂, a temperatura ambiente y presión atmosférica, hasta conversión total del sustrato, seguido por c.c.d. Luego de 12 hs, se añadió agua destilada y la mezcla de reacción fue filtrada, y evaporada bajo presión reducida. Posteriormente, se añadió una solución de HCl 1.5 M (40ml), y la mezcla se mantuvo con agitación a 70 °C por 2 hs. Luego, fue enfriada en un baño de hielo y el pH ajustado a 5 con una solución 10 N de NaOH. A la solución enfriada se le añadieron 3 ml de una solución saturada de BaCl₂. Los sólidos precipitados fueron separados por centrifugación. El sobrenadante fue enfriado nuevamente en un baño de hielo y el pH se ajustó a 7,5. Se añadió, luego, lentamente etanol (1.5 volúmenes) a la solución bajo agitación. La mezcla fue centrifugada y lavada con etanol

El sólido resultante, fue disuelto en 6 ml de agua destilada y pasado por una resina de intercambio iónico, Dowex X2-200 (H⁺) eluyendo con agua destilada. Las fracciones ácidas fueron recolectadas y neutralizadas con una solución 10 N de NaOH. El agua fue removida por liofilización para así obtener el producto **40** con un rendimiento del 68% (0.45 g).

Espectro de ¹H RMN (Cl₃CD, 500 MHz): δ 3.86-3.96 (m, 5 H), 4.02 (dd, J₁=2.8 Hz, J₂= 4.3 Hz, 1 H), 4.08-4.10 (m, 2 H), 4.11-4.16 (m, 1 H), 4.19 (m, 1 H), 5.26 (d, J=2.8 Hz, 1 H), 5.27 (d, J=4.3 Hz, 1H).

Espectro de ¹³C RMN (Cl₃CD, 125 MHz): 63.68 (d, J= 3.63 Hz, C-5), 64.82 (d, J= 3.63 Hz, C-5), 74.19, 75.59, 76.04, 80.43 (d, J=7.27 Hz, C-4), 81.23, 82.20 (d, J=7.27 Hz, C-4), 95.22 (C-1 β), 101.03(C-1 α).

Espectro de ³¹P RMN (Cl₃CD, 202.4 MHz): δ 3.10.

2.3.4.3- Síntesis de 2-desoxirribosa 5-fosfato1,3,5-Tri-O-acetil-2-desoxi- α,β -D-ribofuranosa (41)

Mr: 259

Rf: 0.51 en Hexano/AcOEt 1:1

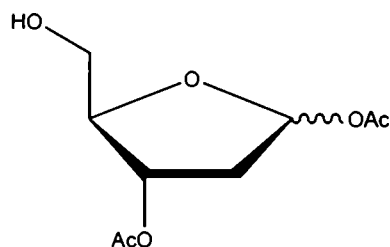
Rendimiento:90%

 $(\alpha:\beta$ 1:1)

A una solución agitada de 2-desoxi- α,β -D-ribosa (0.4 g, 2.98 mmol) en THF (22.5 ml), se añadió anhídrido acético (1 ml, 10.43 mmol), seguido por la adición del biocatalizador Novozyme 435 (CAL B, 0.6 g), y se continuó bajo agitación orbital a 45 °C por 2 h, hasta que se verificó conversión completa a producto por c.c.d. La mezcla fue posteriormente filtrada y el solvente fue evaporado bajo presión reducida. Luego, a la mezcla cruda de reacción, se añadió anhídrido acético (7.5 ml, 80 mmol) y Py (1.5ml, 18.6 mmol), y se continuó agitando toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue volcada sobre agua destilada (20 ml) y extraída con diclorometano. La fase orgánica fue posteriormente lavada con agua destilada y secada con Na_2SO_4 anh. y finalmente evaporada. Luego de la purificación por columna de sílica gel (Hexano/AcOEt 2:1), el producto 1,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-2-desoxirribofuranósido fue obtenido como un aceite incoloro (0.70 g, 90%).

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): 2.04 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.06 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.07 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.08 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.10 (s, 13H, $-\text{CH}_3$), 2.12 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.18 (m, 1H, H- α), 2.34 (dt, $J_1=5.2$ Hz, $J_2=14.4$ Hz, 1H, H-2 β), 2.47-2.49 (m, 2H, H-2 α,β), 4.15-4.19 (m, 3H, H-5 α , 5 β , 5 β), 4.27-4.32 (m, 2H, H4 α , 5 α), 4.42 (q, $J=3.3$ Hz, 1H, H-4 β), 5.14 (m, 1H, H-3 β), 5.23 (ddd, $J_1=7.2$ Hz, $J_2=5.2$ Hz, $J_3=2.8$ Hz, 1H, H-3 α), 6.38 (d, $J=5.2$ Hz, 1H, H-1 β), 6.40 (dd, $J_1=2.4$ Hz, $J_2=5.7$ Hz, 1H, H-1 α).

Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.57 ($-\text{CH}_3$), 20.57 ($-\text{CH}_3$), 20.69 ($-\text{CH}_3$), 20.77 ($-\text{CH}_3$), 20.86 ($-\text{CH}_3$), 21.03 ($-\text{CH}_3$), 38.01 (C-2), 38.13 (C-2), 63.51 (C-5), 64.00 (C-5), 73.58 (C-3), 73.80 (C-3), 82.55 (C-4), 83.01 (C-4), 97.96 (C-1), 98.13 (C-1), 169.77 (CO), 170.04 (CO), 170.32 (CO), 170.36 (CO), 170.55 (CO).

1,3-Di-O-acetil-2-desoxi- α,β -D-ribofuranosa (42):

Mr: 218

Rf: 0.38 en Hexano/AcOEt 1:2

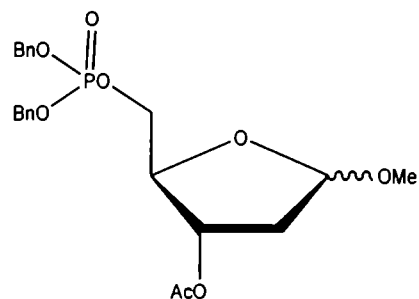
Rendimiento:91%

 $(\alpha:\beta$ 0.9:1)

Siguiendo un protocolo descrito anteriormente², se realizó la reacción de alcoholisis enzimática añadiendo la enzima CAL B (0.81 g, 0.3 g/mmol producto) a una suspensión de 1,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-2-desoxirribofuranósido (0.7 g, 2.69 mmol) en etanol (18.4 ml, 323 mmol) y la mezcla resultante fue agitada por 5 h bajo agitación orbital a 37 °C hasta que se verificó la conversión total a producto mediante c.c.d. Luego, la mezcla fue filtrada y evaporada a sequedad. El residuo resultante fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel (Hexano/AcOEt 1:2) para dar, así, el producto **42** (0.54 g, rendimiento 91%).

Espectro de ¹H RMN (Cl₃CD, 500 MHz): δ 2.07 (s, 2.7H, -CH₃), 2.08 (s, 2.7H, -CH₃), 2.09 (s, 3 H, -CH₃), 2.11 (s, 3 H, -CH₃), 2.17 (m, 1 H, H-2 β), 2.35 (dt, $J_1=5.4$ Hz, $J_2=14.6$ Hz, 0.9 H, H-2 α), 2.53-2.47 (m, 1.9 H, H-2 α , β), 3.70 (dd, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=11.9$ Hz, 0.9 H, H-5 α), 3.78-3.75 (m, 1.9 H, H-5 α , 5 β), 3.82 (dd, $J_1=3.2$ Hz, $J_2=11.9$ Hz, 1 H, 5 β), 4.20 (dd, dd, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=9.1$ Hz, 0.9 H, H-4 α), 4.27 (dd, $J_1=3.2$ Hz, $J_2=7.7$ Hz, 1 H, H-4 β), 5.18 (ddd, $J_1=1.3$ Hz, $J_2=4.5$ Hz, $J_3=7.7$ Hz, 1 H, H-3 β), 5.29 (ddd, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=7.3$ Hz, $J_3=9.1$ Hz, 0.9 H, H-3 α), 6.37 (d, $J=5.4$ Hz, 1H, H-1 β), 6.40 (dd, $J_1=2.2$ Hz, $J_2=5.4$ Hz, 1 H, H-1 α).

Espectro de ¹³C RMN (Cl₃CD, 125 MHz): δ 20.77 (-CH₃), 20.87 (-CH₃), 21.12 (-CH₃), 38.42, (C-2), 62.12 (C-5), 62.98 (C-5), 73.59 (C-3), 73.88 (C-3), 85.79 (C-4), 86.06 (C-4), 98.08 (C-1), 98.26 (C-1), 169.93 (CO), 170.43 (CO), 170.76 (CO), 170.95 (CO).

1,3-Di-O-acetil-2-desoxi- α,β -D-ribofuranosa 5-dibencilfosfato (43):

Mr: 438

Rf: 0.35 en Hexano: AcOEt 7:3

Rendimiento:76%

 $(\alpha:\beta$ 0.6:1)

² Hennen W.; Sweers H.; Wang Y.; Wong C.: *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 4939-4945.

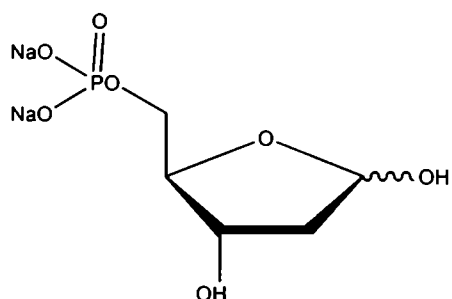
El compuesto **42** seco (0.54 g, 2.47 mmol) fue disuelto bajo atmósfera de N₂ en THF anh. (30 ml). A esta solución se le añadió, con agitación, 1H-tetrazol (1.55 g, 22.23 mmol) hasta disolución del mismo. Luego, fue agregada la dibencil *N,N*-diisopropilfosforamidita (0.83 ml, 2.47 mmol) gota a gota y la mezcla fue agitada 15 minutos adicionales, a temperatura ambiente. Posteriormente, para la oxidación de la fosforamidita, se enfrió la mezcla de reacción a -40 °C en un baño de hielo seco en acetona y se le añadió una solución del reactivo oxidante TBHP en decano (6M, 0.83 ml, 4.94 mmol). Se agitó esta solución por 2 horas a temperatura ambiente, hasta desaparición del sustrato. Finalmente, se detuvo la reacción con una solución 10 % de NaHSO₃ (5 ml) y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (15 ml) y se extrajo secuencialmente como se cita a continuación: 10% NaHSO₃ (3 x 10 ml), 5 % NaHCO₃ (3 x 10 ml) y agua destilada (3 x 10 ml). El extracto se secó con Na₂SO₄ anh. y evaporó a sequedad. El fosfato bencilado fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel (Hexano: AcOEt 7:3), para así obtener el producto puro con un 76% de rendimiento (**43**, 0.82 g)

Espectro de ¹H RMN (Cl₃CD, 500 MHz): δ 2.04 (s, 1.8 H, -CH₃), 2.06 (s, 3H, -CH₃), 2.07 (s, 3 H, -CH₃), 2.09 (s, 1.8 H, -CH₃), 2.19 (m, 1 H, H-2β), 2.30 (m, 1.6 H, H2α, β), 2.41 (ddd, J₁=2.4 Hz, J₂=7.2 Hz, J₃=14.4 Hz, 0.6 H, H-2α), 4.08-4.19 (m, 3.2 H, 5α, β), 4.24 (q, J=5.2 Hz, 0.6 H, H-4α), 4.32 (q, J=2.8 Hz, 1 H, H-4β), 5.00-5.15 (m, 6.4 H, -CH₂(Bn)), 5.08 (ddd, J₁=1.4 Hz, J₂=2.8 Hz, J₃=6.2 Hz, 1 H, H-3β), 5.23-5.39 (m, 0.6 H, H-3α), 6.29 (d, J = 5.2 Hz, 1H, H-1β), 6.37 (dd, J₁= 2.4 Hz, J₂= 5.7 Hz, 0.6 H, H-1α), 7.35 (s, 16 H, arom.).

Espectro de ¹³C RMN (Cl₃CD, 125 MHz): δ 20.78 (-CH₃), 20.83 (-CH₃), 21.03 (-CH₃), 21.13 (-CH₃), 38.03 (C-2), 38.12 (C-2), 66.68 (d, J= 5.4 Hz, C-5) 69.29 (d, J= 5.4 Hz, -CH₂(Bn)), 69.33 (d, J= 5.4 Hz, -CH₂(Bn)), 73.51 (C-3), 73.60 (C-3), 83.02 (d, J=7.2 Hz, C-4), 83.96 (d, J=7.2 Hz, C-4), 98.85 (C-1), 98.37 (C-1), 128.51, 128.46, 127.88, 135.57 (d, J=5.4 Hz)(arom.), 170.04 (CO), 170.20 (CO), 170.56 (CO), 170.82 (CO).

Espectro de ³¹P RMN (Cl₃CD, 202.4 MHz): δ -1.18 , -0.96 .

2-desoxi-α,β-D-ribose 5-fosfato (sal disódica) (**44**):



Mr: 258

Rf: 0.20NH₃/isopropanol/H₂O 9:9:2

Rendimiento:72 %

Una solución del compuesto **43** (0.82 g , 1.8 mmol) en 15 ml de AcOEt fue hidrogenada con 200 mg del catalizador, Pd(OH)₂, a temperatura ambiente y presión atmosférica hasta conversión total del sustrato, seguido por c.c.d. Luego de 12 h se añadió agua destilada y la mezcla de reacción fue filtrada, y evaporada bajo presión reducida. Posteriormente, se añadió una solución de HCl 1.5 M (17 ml), y la mezcla se mantuvo con agitación a 70 °C por 2 h. Luego, fue enfriada en un baño de hielo y el pH ajustado a 5 con una solución 10 N de NaOH. A la solución enfriada se le añadieron 3 ml de una solución saturada de BaCl₂. Los sólidos precipitados fueron separados por centrifugación. El sobrenadante fue enfriado nuevamente en un baño de hielo y el pH se ajustó a 7,5. Luego, se agregó lentamente etanol (1.5 volúmenes) a la solución bajo agitación. La mezcla fue centrifugada y lavada con etanol. El sólido resultante, fue disuelto en 6 ml de agua destilada y pasado por una resina de intercambio iónico, Dowex X2-200 (H⁺) eluyendo con agua destilada. Las fracciones ácidas fueron recolectadas y neutralizadas con una solución 10 N de NaOH. El agua fue removida por liofilización para así obtener el producto **44** con un rendimiento del 72 % (0.34 g).

Espectro de ¹H RMN (Cl₃CD, 500 MHz): δ 2.07-2.11 (m, 2.3 H, H-2), 2.34-2.41 (m, 2.3 H, H-2), 3.67-3.72 (m, 2.3 H), 3.74-3.77 (m, 2.3 H), 3.92-3.96 (m, 1 H), 4.13-4.16 (m, 1 H), 4.25-4.28 (m, 1.3 H), 4.38-4.42 (m, 1.3 H), 4.74 (sa, 4.6 H, OH), 5.49-5.53 (m, 2.3 H, H-1a,b).

Espectro de ³¹P RMN (Cl₃CD, 202.4 MHz): δ 2.02, 3.59.

2.3.4- Sobreexpresión de la enzima PPM de Escherichia coli

2.3.4.1- Obtención de la secuencia de la PPM y diseño del cebador.

La secuencia nucleotídica que codifica para la enzima PPM de *E. Coli* fue obtenida del banco de genes GenBank en el sitio de la NCBI, www.NCBI.NLM.NIH.GOV (Número de acceso: U14003), y se determinó el marco abierto de lectura (ORF) correspondiente. Luego, se diseñaron los oligonucleótidos para ser utilizados como cebadores, utilizando el programa "oligo 6.0 (Cambio S.R.L.)". Los oligonucleótidos seleccionados para la reacción de amplificación fueron los siguientes:

Cebador directo (*Forward primer*) : 5' ggatccATGAAACGTGCATTTATTATGG 3'

Cebador reverso (*Reverse primer*): 5' ggtaccCTTTTGTGACATAACAAAGGC 3'

2.3.4.2- Amplificación del gen de la PPM mediante PCR

El método denominado reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó para amplificar el gen a ser clonado. Para lo mismo se empleó la enzima ADN polimerasa Taq a una concentración 2U/100µl. Se utilizó una concentración 2 mM de MgCl₂. Todas las reacciones se realizaron con buffer Taq, 100 ng de cada cebador y 200 µM de dNTPs en un volumen final de 50 µl. Como templado se utilizó 500 ng de un lisado de *E. Coli*.

Las condiciones de PCR fueron:

Paso	Temp. °C	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	1	35
Anidado	55	1	
Elongación	72	1	
Elongación final	72	10	1
Final	4	----	1

Tras la reacción se comprobó la correcta amplificación de la secuencia de la PPM mediante electroforesis en geles de agarosa. Su identidad fue confirmada por mapeo con enzimas de restricción.

2.3.4.3- Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa utilizados se prepararon con buffer TAE 1X al 0.7-1.5 % con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. Antes de sembrar, las muestras se resuspendieron con el correspondiente volumen de buffer de siembra. Los geles fueron visualizados y fotografiados con el equipo Baby-Imager de Applied Oncor.

2.3.4.4- Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las enzimas utilizadas fueron de Amersham Pharmacia Biotech, Promega o GibcoBRL. Se utilizaron 5 unidades de enzima por µg de ADN a digerir incubando en los buffers y temperaturas sugeridas por el fabricante durante un mínimo de 3 horas.

2.3.4.5- Construcción del plásmido PPM en el vector de expresión pGEM-T Easy

Para la correcta expresión de la proteína, se construyó en primera medida, un plásmido utilizando el vector de expresión comercial denominado pGEM-T Easy. Este sistema es conveniente para la clonación de productos amplificados por medio de PCR. Los fragmentos obtenidos por PCR se clonaron en el vector pGem-T Easy utilizando para ello el kit pGem-T Easy vector System I (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El vector de expresión se denominó pGEM-T-PPM.

Se determinó la identidad del gen mediante un mapeo con enzimas de restricción, para lo cual se digirió el plásmido con la enzima de restricción EcoRI. Los productos de digestión se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa.

2.3.4.6- Ligación de fragmentos de ADN

Las ligaciones se realizaron con una relación molar de inserto:vector de 3:1 utilizando 50 ng de vector en un volumen final de 10 μ l con 0.1 U de T4 ADN ligasa. Las incubaciones fueron a 16°C durante toda la noche o a temperatura ambiente por 3 horas.

2.3.4.7- Construcción del plásmido de expresión en el vector de expresión pRSET-A

Posteriormente se escindió del vector de clonado el inserto correspondiente al gen que codifica para la PPM incubando el plásmido pGEM-T-PPM con la enzima de restricción EcoRI. Se purificó por geles de agarosa y se subclonó el gen de interés en el vector de expresión pRSET-A utilizando el kit pRSET-A-vector System (Stratagem).

Para determinar la correcta inserción del gen en el vector de expresión se mapeó con enzimas de restricción. Para esto, se incubó el plásmido con las enzimas de restricción Hind III y Pst I, obteniéndose los fragmentos esperados, los cuales se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa. El plásmido obtenido se lo denominó pRSET-A-PPM.

2.3.4.8- Extracción y purificación del plásmido. Secuenciación

Para aislar el ADN plasmídico se obtuvo un cultivo denso de una colonia de la estirpe portadora del plásmido en medio rico LB con ampicilina a 37 °C. Se centrifugaron 5 ml del cultivo en tubos de 45 ml a 10000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante por aspiración, dejando seco el sedimento bacteriano. Las células se resuspendieron en 200 μ l de una solución de tris-sacarosa y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Luego se adicionaron 300 µl de una solución de EDTA-triton-Lisozima, se invirtió el tubo suavemente varias veces y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, para pasar otros 10 minutos a 70 °C. El lisado obtenido se centrifugó a 7000 g durante 30 minutos. Luego se purificó el ADN mediante extracciones con mezclas de fenol/cloroformo. Esto involucra varios pasos de extracción siendo el primero la extracción de una solución acuosa del lisado con una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y, posteriormente, con cloroformo/alcohol isoamílico. Las fases acuosas y orgánicas se separaron por centrifugación durante 5 minutos a 4 °C y se recuperó la fase acuosa. Este procedimiento se repitió dos veces. Luego se concentró el ADN mediante precipitación, para lo cual se añadió acetato sódico (pH 5,2) a una concentración final de 0.3M, se mezcló y se añadió un volumen de isopropanol (el doble del volumen de la solución) y se agitó vigorosamente. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se centrifugó. Se recuperó el sedimento y se secó el etanol remanente a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió el ADN aislado en 100 µl de agua y se agitó para su correcta disolución. El ADN fue secuenciado.

2.3.4.9- Transformación del vector de expresión en *E coli* competente

La transformación involucró la introducción del plásmido recombinante PRSET-A-PPM en células bacterianas. Para ello se utilizó, en primer lugar, la cepa de *Escherichia coli* DH5- α , útil para su transformación con plásmidos recombinantes derivados del vector. Se utilizó para la transformación, un cultivo de dicha cepa con bacterias competentes. Se llevó a cabo esta transformación por el método de "Shock-Térmico": Para lo cual, se incubaron bacterias de *E coli* DH5- α competentes con el vector durante 15 minutos. Luego, se aplicó luego un golpe térmico dejando a las bacterias 1.5 minutos a una temperatura de 42 °C. Posteriormente se agregó 1 ml de medio LB y se dejó en estufa a 37 °C durante 30 minutos. Finalmente se centrifugaron y se plaquearon las mismas, sobre una placa de petri con LB-agar, ampicilina y X-gal. Se analizaron las colonias por aparición del color azulado debido a la reacción colorimétrica con X-gal. Luego se miniprepararon los plásmidos por el método de lisis alcalina y se chequeó la presencia del inserto utilizando enzimas de restricción y analizando los fragmentos por electroforesis en geles de agarosa.

La segunda etapa consistió en transformar con el plásmido PRSET-A-PPM la cepa de *E. coli* BL21 competente, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Se plaquearon las células transfectadas en medio LB sólido con ampicilina, se hicieron crecer en medio LB líquido con ampicilina y finalmente se indujeron con IPTG, para verificar la correcta tranfección (se

describe, posteriormente en detalle, esta metodología). Se realizó asimismo, un control, sin inducción.

2.3.4.10- Crecimiento de las células clonadas e inducción de la expresión de la PPM

Para la sobreexpresión de la enzima PPM-(HIS)₆, las células de *E. Coli* transfectadas fueron crecidas en medio LB sólido situado en placas de petri, conteniendo los mismos, 100 µg/ml de ampicilina y 40 µg/ml de cloranfenicol, incubando las células toda la noche a 37 °C. Se escogieron las colonias y se preincubaron en 5 ml de medio LB líquido con la misma concentración de antibióticos que en el medio sólido, toda la noche a 37 °C. Luego, a 250 ml de medio líquido junto con los antibióticos, se le añadieron 1 ml de las células preincubadas, y se incubaron con agitación orbital a 37 °C, hasta que la densidad óptica de la solución celular alcanzara el valor de 0.8, medido a 600 nm. Luego, se indujo la expresión proteica añadiendo una solución acuosa del inductor isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), hasta una concentración final de 1 mM, y se extendió la incubación por 4 horas adicionales. Los tiempos de crecimiento e inducción fueron optimizados experimentalmente, comparando en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) los perfiles de expresión. Posteriormente, el medio se centrifugó (10000 rpm, 15 min, 4°C), y se resuspendió el pellet celular en el buffer de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl).

2.3.5- Purificación y concentración de la enzima recombinante

2.3.5.1- Purificación de la proteína recombinante con resina Ni-NTA

Las células se lisaron por sonicación. El extracto celular fue centrifugado (10000 xg, 15 min, 4°C), y el sobrenadante fue sembrado en una columna de Ni-ácido nitriloacético-agarosa (QIAGEN) equilibrada con el buffer de lisis. Se realizó la cromatografía de afinidad en condiciones nativas, como se cita a continuación: el sobrenadante fue incubado con 4 ml en la resina de Ni-NT-agarosa con agitación por dos horas. Esta solución fue cargada en una columna de acrílico y la columna fue lavada 4 veces con el buffer de lavado. La proteína fue eluida con 15 ml de buffer de elución. La purificación fue verificada por SDS-PAGE, y los mismos fueron revelados por tinción con coomassie blue.

2.3.5.2- Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida (0.1 % SDS). El gel constó de dos partes, una superior o gel de empaquetamiento de 1 cm de longitud (4 % poliacrilamida) y a continuación una inferior o gel de separación, de 5 cm de longitud (10% poliacrilamida). Las muestras a ser analizadas se prepararon agregándoles los volúmenes correspondientes de buffer de siembra y calentándolas por 3-5' a 100°C. Los marcadores de peso molecular utilizados cubrían los rangos 6.5 a 83 kDa (Sigma). El gel se montó en la cubeta de electroforesis y se añadió el buffer de migración 1X en la cámara interna y externa, hasta cubrir el mismo. El tiempo de corrida fue de 50 minutos, aplicando un campo eléctrico de 250 V.

2.3.5.3- Diálisis y concentración de la enzima purificada

El eluido cromatográfico que contenía la proteína recombinante, fue dializado contra buffer Tris 80 mM pH=8, EDTA 15 mM y posteriormente dializado contra buffer Tris pH=8, 80 mM. La solución proteica fue concentrada utilizando polietilenglicol (PM 8000 Dalton). Luego, se le añadió al concentrado proteico urea hasta una concentración final de 6M, y se dejó 2 h a 4°C con agitación mecánica. Finalmente, la solución con el desnaturalizante fue dializada contra agua destilada, agregada lentamente por goteo, a la membrana de diálisis, para el correcto plegamiento de la proteína y, por último, dializada contra buffer tris 80 mM pH=8, EDTA 0.2 mM y MnCl₂ 1 mM (buffer de almacenamiento). En todos los casos la concentración de la proteína fue determinada por el método de Bradford utilizando albumina bovina sérica como estándar.

2.3.6- Ensayos de actividad

Para los ensayos de optimización de la actividad enzimática de la PPM sobreexpresada, se midieron la cinética y el rendimiento de una reacción modelo. Para lo cual se determinó la aparición del nucleósido adenosina, a partir de ribosa 5-fosfato y la base adenina, en presencia de una cantidad dada de la enzima sobreexpresada y la PNP comercial. Se variaron para estos ensayos las concentraciones de enzima, sustrato, MnCl₂, glucosa-1,6-difosfato y el inhibidor fosfato inorgánico, así como el pH y la temperatura de reacción.

Luego de encontrar las condiciones óptimas los ensayos de actividad se realizaron como se describe a continuación: se preincubó a 37°C un 1 ml de una mezcla de reacción que

contenía los siguientes reactivos (en concentraciones finales): adenina 6 mM, buffer Mops 100 mM (pH=7), $MnCl_2$ 1 mM, β -mercaptoetanol 200 mM, 0.03 mg de PPM y un exceso de la PNP. La reacción se inició por la adición del sustrato, ribosa 5-fosfato (1 mM) y se cortó a diversos tiempos, por la adición de una solución de HCl. La aparición de la adenosina se siguió por HPLC.

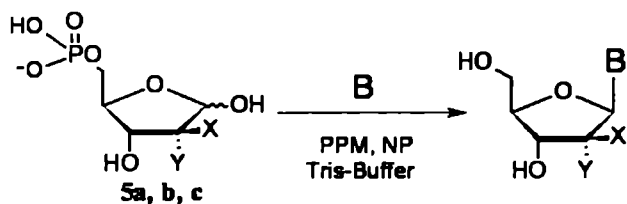
2.3.7- Procedimiento general para la síntesis de diversos nucleósidos naturales y modificados

2.3.7.1- Síntesis enzimática de nucleósidos

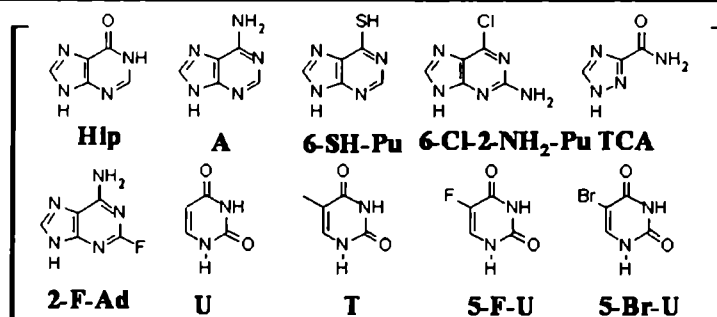
Para la síntesis de diversos nucleósidos naturales y/o modificados se agitó a 37 °C, con agitación orbital de 200 rpm, una solución que contenía: 0.2 ml de una solución acuosa de β -mercaptoetanol 1 M, 0.1 ml de una solución acuosa de $MnCl_2$ 10 mM, 0.2 ml de una solución acuosa de la base correspondiente 30 mM, 0.23 ml de buffer Tris pH=8, 0.43 M, 0.2 ml de la solución de PPM (0.15 mg/ml) y 0.05 ml de la solución acuosa de PNP o TP según corresponda (100 U/ml). La reacción se inició con la adición del azúcar 5-fosfato (0.02 ml de una solución acuosa de concentración 50 mM).

2.3.7.2- Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)

La aparición de nucleósidos fue determinada por HPLC, para lo cual se utilizó un equipo Gilson equipado con una columna C-18 (150mm x 4 mm x 5 μ m) a un flujo de 1 mL/min. El detector UV se ajustó a la longitud de máxima absorción de cada nucleósido (Tabla 2.2) y la columna fue operada a temperatura ambiente. Todas las curvas de calibración fueron realizadas con material de referencia comercial (Sigma-Aldrich) de conocida pureza y por la metodología de estándar externo.



Comp	x	y	B	λ (nm)	condiciones
6	H	OH	Hyp	254	A
7	H	OH	Ad	254	A
8	H	OH	6-SH-Pu	320	A
9	H	OH	6-Cl-2-NH ₂ -Pu	263	B
10	H	OH	2-F-Ad	254	A
11	H	OH	TCA	209	C
12	OH	H	Hyp	254	A
13	OH	H	Ad	254	A
14	OH	H	6-SH-Pu	320	A
15	OH	H	TCA	209	C
16	H	H	T	254	D
17	H	H	U	254	D
18	H	H	5-F-U		D
19	H	H	5-Br-U		D



Condiciones de corrida:

Condición A: 0-5 min 4% MeOH/ 96% buffer fosfato 25 mM pH=3

5-9 min 10% MeOH/ 90% buffer fosfato 25 mM pH=3

9-10 min 4% MeOH/ 96% buffer fosfato 25 mM pH=3

Condición B: isocrática 10% MeOH / 90% buffer fosfato 25 mM pH=3

Condición C: isocrática 100% buffer fosfato 25 mM pH=3

Condición D: isocrática 8% MeOH / 90% buffer fosfato 25 mM pH=3

Tabla 2.2. Condiciones de corrida de HPLC

2.3.8- Inmovilización enzimática

2.3.8.1- Inmovilización en geles de sílice-PVA

2.3.8.1.1- *Preparación del sol-gel de sílice*

El sol gel de sílice fue obtenido por el método de catálisis ácida en una sola etapa, empleando TEOS como precursor, para lo cual, se mezclaron 4 ml de TEOS, 1.25 ml de agua hexadestilada y 36 μ l of HCl (0.6 M), agitándose la solución vigorosamente por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se obtuvo el sol-gel luego de remover el etanol de la preparación diluida (se añadió 1 ml de agua por ml de gel obtenido) por evaporación a presión reducida, hasta una pérdida de masa de 0.62 g, que corresponde a la cantidad estequiométrica de etanol producido como subproducto de la reacción de hidrólisis.

2.3.8.1.2- *Procedimiento general para la inmovilización de la enzima PPM en sol-geles de sílice-PVA*

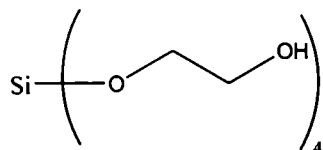
Se obtuvieron los hidrogeles de sílice-PVA-PPM mezclando la cantidad apropiada del sol-gel acuoso de sílice (10% en sílice), 0.2 ml de una solución de PPM en buffer tris 100 mM (pH=8), agua destilada y la cantidad apropiada de una solución acuosa de PVA (10 % p/v). Se llenaron, rápidamente, jeringas de 1 ml con la solución generada y luego se colocaron las jeringas a 4°C por 2 h, para así permitir el envejecimiento del hidrogel. Finalmente, los hidrogeles envejecidos fueron unidireccionalmente congelados, introduciendo la jeringa a una velocidad constante (5,9 mm/min) dentro de un baño de N₂(l) mantenido a una temperatura constante de 77 K (este procesamiento de los geles se denomina ISISA). Por último, las muestras congeladas fueron liofilizadas.

2.3.8.1.3- *Ejemplo de preparación de hidrogeles de sílice (1.6% p/p)-PVA(6.4% p/p)-PPM*

Los hidrogeles fueron obtenidos mezclando 0.1 ml del sol gel de sílice, 0.06 ml de agua destilada, 0.64 ml de una solución acuosa de PVA (10 % p/v) y 0.2 ml de la solución de PPM (0.15 mg/ml) en buffer tris 100 mM (pH=8).

2.3.8.2- Inmovilización en geles de sílice-quitosano

2.3.8.2.1- *Síntesis del monómero tetra(2-hidroxietil)ortosilicato (THEOS)*



Mr: 272
Pureza: 80 %

Se mezcló en un balón TEOS (10 ml, 44.7 mM) con etilenglicol recién destilado (10 ml, 179 mM). La mezcla de reacción se calentó a 150°C por 36 hs conectada a una columna de destilación para así destilar el etanol producido como subproducto de la reacción. Se obtuvo el producto deseado THEOS, junto con mezclas de productos de ciclación intramolecular, luego de remover el etanol y los materiales de partida, por destilación a presión reducida, con una pureza de aproximadamente 80%.

Espectro de RMN ^1H δ ppm: 4.80 (sa, 4H, OH), 3.98-3.88 (m, 6H, CH₂(c)), 3.73-3.70 (m, 8H; CH₂(a)), 3.47-3.44 (m, 8H; CH₂(a))

(a): acíclica, (b):cíclica

2.3.8.2.2- *Procedimiento general para la inmovilización de la enzima PPM y la coinmovilización de las enzimas PPM/PPN en sol-geles de sílice-quitosano*

Para la inmovilización de la enzima PPM y para la co-inmovilización de las enzimas PPM/PPN en sol-geles de sílice-quitosano, en primer lugar, se formó una solución homogénea de las mezclas de PPM/quitosano o PPM/PPN/quitosano, respectivamente, mezclando la solución ácida de quitosano (2.5 % p/v) con 0.2 ml de la solución de PPM (0.15mg/ml) o con 0.2 ml de la solución de PPM (0.15mg/ml) y 0.025 ml de una solución de PNP (100 U/ml). Luego se añadió a las mezclas homogéneas, el precursor sintetizado, THEOS. Posteriormente, las soluciones se mantuvieron a 4°C por 2 h, para así permitir el envejecimiento de los hidrogeles. Finalmente, los hidrogeles envejecidos fueron unidireccionalmente congelados, introduciéndolos dentro de un baño mantenido a una temperatura constante de 77 K. Por último, las muestras congeladas fueron liofilizadas.

2.3.8.2.3- Ejemplo de preparación de hidrogeles de sílice (10% p/p)-quitosano (0.4% p/p)-PPM

Los hidrogeles fueron obtenidos mezclando 41 µl del precursor THEOS, 219 µl de buffer tris 100 mM (pH =8), 80 µl de una solución acida de quitosano (2.5 % p/v) y 200 µl de la solución de PPM (0.15 mg/ml) en buffer tris 100 mM (pH=8).

2.3.8.2.4- Ejemplo de preparación de hidrogeles de Sílice (10% p/p)-quitosano (0.4% p/p)-PPM/PNP

Para la co-inmovilización de la PPM y PNP, se siguió el mismo procedimiento citado previamente para la inmovilización de la enzima PPM en sol-geles de sílice-quitosano, pero incorporando a la mezcla de reacción 200 µl de una solución de PPM (0.15 mg/ml) en buffer tris 100 mM (pH=8) y 25 µl de una solución de PNP (100 U/ml), disminuyendo proporcionalmente la cantidad de buffer añadido.

2.3.8.2.6- Co-inmovilización de las enzimas PPM y PNP en sol geles de sílice-quitosano recubiertos de agar

Para la co-inmovilización de las enzimas PPM y PNP, se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para la preparación de hidrogeles.

Para el recubrimiento con agar, los geles liofilizados fueron sumergidos varias veces en una solución de agar 2,5 % p/v, mantenida a 60 °C en un baño de agua. Luego, fueron sumergidos en aceite de girasol comercial y lavados varias veces, primero con hexano, y luego con buffer Tris 100 mM (pH=8).

2.3.9- Elucidación estructural y funcional de la enzima PPM

2.3.9.1- Modelado por homología

El modelado por homología aprovecha las similitudes de secuencias de aminoácidos y las similitudes estructurales entre proteínas, construyendo una estructura tridimensional para la secuencia incógnita, usando las estructuras tridimensionales conocidas de otras proteínas, cuyas secuencias de aminoácidos guardan similitud con la secuencia incógnita.

Las etapas básicas del modelado se pueden resumir en las siguientes acciones: identificar una o varias secuencias homólogas, luego, alinearlas correctamente y finalmente generar el modelo de la proteína en cuestión para por último, validarlo.

Para el modelado de la enzima PPM por homología primero se debió obtener la secuencia aminoacídica de la enzima, del banco de datos depositado en el sitio UniProt y se grabó en formato FASTA. El código de acceso directo a la secuencia es el P0A6K6. Luego se procedió a la búsqueda de las secuencias homólogas con estructuras tridimensionales conocidas. La identificación de las proteínas homólogas y el alineamiento se obtuvo utilizando el HHpred server (Homology detection & structure prediction by HMM-HMM comparison)³ aplicando los parámetros comunes, eligiendo las bases de datos de PDB y SCOP (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). La búsqueda en la base de datos fue realizada con el programa de HHsearch para la comparación de HMM-HMM.

Una vez obtenida la lista de los posibles templados, se seleccionó el más apropiado, o sea, la secuencia con mayor porcentaje de identidad y menor número de omisiones (gaps). El templado utilizado fue la estructura de rayos X de la fosfopentomutasa de *Streptococcus mutans* (PDB 2i09_A) que comparte un 43% de identidad con la PPM en estudio.

El programa MODELLER (versión 6v2), incluido en el sitio HHpred, fue utilizado para construir el modelo tridimensional de la PPM. Como se esperaba, el esqueleto carbonado del modelo generado y el templado se superponen correctamente (RMSD: 0.49 calculado por el programa swiss pdb viewer). También se compararon los gráficos de Ramachandran, (swiss pdb viewer) como indicador de la validez del modelo.

La PPM es una metaloproteína, que contiene en su sitio activo un sitio de unión a metales donde se ubican dos iones manganeso. Pertenece a una superfamilia de enzimas denominada superfamilia de fosfatasas alcalinas. Es similar estructural y funcionalmente a una enzima perteneciente a la superfamilia denominada difosfogliceratomutasa independiente. Éstas comparten el sitio de unión a metal. El modelo obtenido por homología, no contenía los

³ Söding, J.; Biegert, A.; Lupas, A.; *Nucleic Acids Research*, 2005, 33; W244-W248

iones manganeso en su sitio activo, por lo que para obtener el modelo final, se precedió incorporarlos. Para ello, en primer lugar se añadieron los metales manualmente, por superposición de las estructuras de la PPM y IPGM. Para esto, se utilizó el programa swiss pdb viewer, optimizándose luego la geometría de la metaloproteína por dinámica molecular. Las dinámicas moleculares se realizaron utilizando el campo de fuerzas AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement), y la suite de programas utilizados para las simulaciones denominado también AMBER. El programa preparatorio utilizado fue el LEaP, y el utilizado para el cálculo energético fue el denominado SANDER.

Se evaluó la validez de la minimización por dinámica molecular comparando las distancias metal residuo de unión a metal, y por superimposición de las estructuras de la proteína previa y posterior a la dinámica molecular generada.

2.3.9.2- Determinación del sitio de unión a sustrato

Un prerequisite para el docking de pequeñas moléculas de ligando en proteínas es la determinación del sitio donde dicho ligando interactúa con la proteína. Esta determinación se realizó mediante diversas metodologías.

En primer lugar se explotaron las similitudes funcionales y estructurales que comparte con la IPGM. Debido a que existe gran cantidad información estructural y funcional de la IPGM, se puede inferir información de la enzima de interés.

Para verificar la validez de las comparaciones se realizó en primer lugar una superposición estructural de diversas PPMs y de diversas IPGMs. Este análisis se realizó utilizando el programa DALI http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/. Asimismo se realizó una superposición estructural de la PPM de *E coli* y de la IPGM (PDB 1o98), ambas secuencias mostraron un alto grado de similitud, este análisis fue realizado por el programa HHpred.

Además, se estudiaron los sitios de unión mediante métodos computacionales. Se utilizó el programa denominado LIGSITE⁴, <http://gopubmed2.biotec.tu-dresden.de/cgi-bin/index.php>. LIGSITE es un programa desarrollado para la detección automática y rápida de cavidades en la superficie de proteínas que pueden actuar como sitios de unión para pequeñas moléculas de ligando. Para lo mismo se cargó el PDB de la PPM minimizada, y se obtuvieron diversos PDBs, en los cuales se remarcaban los aminoácidos ubicados en los posibles sitios de unión a ligando.

⁴ Hendlich, M.; Rippmann, F.; Barnickel, G.; *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 1997, 15, 359–363

Finalmente, se estudió la conservación aminoacídica entre las secuencias de diversos miembros de la familia de la fosfopentomutasa, utilizando el programa CLUSTWAL-W, localizado en la URL <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Se eligió para el estudio de alineación de secuencias, las secuencias de 88 fosfopentomutasas bacterianas de diversas cepas de similar peso molecular, con menos de un 90% de redundancia entre las secuencias.

2.3.9.3- Determinación del modo de unión

Para la determinación de los residuos del sitio activo de la enzima, se utilizó el programa de reconocimiento molecular o docking, AUTODOCK⁵ v 4.0.

2.3.9.3.1- Estudios preliminares en sistemas conocidos. Evaluación de la carga del metal y de la eficiencia de los experimentos de reconocimiento molecular en metaloproteínas utilizando el programa AUTODOCK

Para investigar la precisión del docking de sustratos pequeños a metaloproteínas y el efecto de la carga formal del ión manganeso, se realizó un estudio preliminar de reconocimiento molecular de un sustrato con una metaloproteína del cual, su modo de unión, fue determinado experimentalmente. Se eligió para estos experimentos la enzima IPGM y el sustrato 2-fosfoglicerato (2PGA). La estructura cristalina de la proteína (PDB 1o98) fue colectada de la base de datos depositada en el RCSB PROTEIN DATABANK (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>), así como el PDB del 2PGA. Se utilizaron las herramientas AUTODOCKTOOLS⁶, para añadir hidrógenos polares y cargas parciales tanto a la proteína como al ligando utilizando las cargas de United Atom y Gasteiger, respectivamente. Los parámetros de solvatación y los volúmenes fragmentales para la proteína fueron asignados utilizando la herramienta ADDSOL (incluida en el paquete del programa de herramientas). Las torsiones flexibles en el ligando fueron asignadas con el modulo de AUTOTORS, permitiéndose la rotación libre de todos los ángulos diedros. La carga formal del manganeso fue añadida manualmente en los archivos .pdbq generados por las herramientas del programa autodock. Los campos de afinidad de la grillas fueron generados utilizando el programa auxiliar AUTOGRID. Se utilizó el algoritmo genético GA-LS híbrido para desarrollar los experimentos de reconocimiento molecular, con los parámetros definidos por el programa. Para los iones

⁵ Pospisil, P.; Folkers, G.; *FABAD J. Pharm. Sci.*, 2004, 29, 81-92

⁶ Sanner, M.; Duncan, B.; Carrillo, C.; Olson, A.; *Pac. Symp. Biocomput.*, 1999, 401-4129

manganeso se usaron los potenciales del campo de fuerza de AMBER, definidos en el programa AUTODOCK.

Para el proceso de docking el campo de la grilla fue definido como un cubo de 50 Å centrado en el ligando, con los puntos de la grilla separados por 0.375 Å. Para el modelado de los enlaces de hidrógeno y de las interacciones de Van der Waals, se utilizaron los parámetros de Lennard-Jones 12-10 y 12-6, respectivamente. Las conformaciones resultantes del experimento de docking fueron agrupadas en familias con modos de unión similar, con una tolerancia entre grupos, de la desviación cuadrática media (RMSD) de 2 Å. La energía de docking representó la suma de la energía intermolecular y de la energía interna del ligando mientras que la energía libre de unión, la suma de la energía intermolecular y la energía libre de torsión⁷. La eficiencia del experimento fue medida basada en la RMSD de los ligandos obtenidos por el experimento de docking relativos al obtenido experimentalmente. Se calcularon, asimismo las distancias metal-fosfato y metal-proteína (programa swiss pdb viewer).

2.3.9.3.2- Experimentos de reconocimiento molecular- selección de las condiciones experimentales

Luego, se exploró el efecto de la carga del manganeso, en el experimento de reconocimiento molecular de la ribosa 5-fosfato por la PPM. El PDB del sustrato fue extraído de la base de datos depositada en el RCSB PROTEIN DATABANK (Se encontró un archivo de un complejo proteico de este sustrato y se extrajo del mismo utilizando el programa de swiss pdb viewer). La conformación del sustrato así como su carga, fueron optimizadas utilizando el servidor llamado Dundee PRODRG2 en el URL www.davacpc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg. El procedimiento seguido para realizar los experimentos de reconocimiento molecular fueron los mismos que los descriptos para el experimento preliminar, detallados previamente, excepto por la localización del centro de la grilla. En primer lugar se aplicó el procedimiento de docking a toda la proteína blanco, sin la imposición de un sitio de unión. Esto se denomina "reconocimiento molecular a ciegas" o "*blind docking*". Se realizó con el objeto de evaluar si el sustrato se ubicaba, luego del experimento de reconocimiento molecular, en el sitio de unión propuesto anteriormente. Para lo cual, se centró la grilla en la mitad de la proteína con los puntos de la grilla separados por 1 Å. El campo de la grilla fue definido como un cubo de 50 Å de lado. De esta forma se cubrió todo el espacio de la proteína.

⁷ Ewing, T.; Kuntz, I.; *J. Comput. Chem.*, 1997, 18, 1175–1189

Luego se realizó un experimento de reconocimiento molecular en el sitio activo propuesto de la enzima. Esta vez, se centró la grilla en uno de los iones manganeso, con los puntos de la grilla separados por 0.375 Å. El campo de la grilla fue definido como un cubo de 50 Å de lado.

2.3.9.3.3- Experimentos de reconocimiento molecular evaluando como ligando las furanosas 5-fosfato.

Se realizaron experimentos de reconocimiento molecular, evaluando la afinidad y el modo de unión de los ligando conocidos para la PPM, desoxirribosa 5-fosfato, ribosa 5-fosfato y arabinosa 5-fosfato al modelo de la proteína. Como no existe información acerca de la conformación de los ligandos unidos a la proteína, se debieron realizar experimentos de reconocimiento molecular con los anómeros α y β de las tres furanosas de interés, así como con las formas acíclicas de los azúcares en cuestión, con las condiciones óptimas halladas en el paso anterior (carga formal del metal 2 y ubicando la grilla centrada en el metal).

2.3.9.3.4- Experimentos de reconocimiento molecular evaluando como ligando las β -D-furanosas 1-fosfato

Debido a la complejidad de los sustratos previamente estudiados y la falta de información de la actividad de la PPM frente a los mismos, se decidió realizar los ensayos de reconocimiento molecular con los ligandos furanosas 1-fosfato. Se sabe que el anómero que reconoce la enzima para la reacción transferasa, es el anómero α y, además existe información bibliográfica comparando la actividad de la enzima frente a diversas furanosas 1-fosfato.

Por este motivo se decidió realizar experimentos de reconocimiento molecular, evaluando el modo de unión de: α -D-ribosa 1-fosfato (R-1-P), α -D-desoxirribosa 1-fosfato (D-1-P) y α -D-arabinosa 1-fosfato (A-1-P). El procedimiento seguido para estos experimentos fue el mismo que el aplicado a las furanosas 5-fosfato.

Asimismo, se realizaron experimentos de reconocimiento molecular, incrementando el número de conformeros obtenidos en el análisis, para poder realizar un análisis estadístico del modo de unión de estos ligandos. El número de conformeros obtenidos fue de 100 por cada experimento.

Capítulo 3

Síntesis de furanosas 5-fosfato

3.1- Objetivos y resumen

El objetivo de este capítulo es presentar la estrategia empleada para la síntesis de diversas furanosas 5-fosfato, materiales de partida en la síntesis quimio-enzimática de nucleósidos, tanto naturales como modificados, propuesta en esta tesis. El principal propósito fue desarrollar una estrategia quimio-enzimática versátil para la síntesis de furanosas 5-fosfato, partiendo de los azúcares libres. Con este fin, se protegieron químicamente todas las funciones hidroxílicas de diversas pentosas. Luego se procedió a la desprotección regioselectiva del grupo protector en la posición 5 de las pentosas estudiadas mediante el uso de reacciones biocatalizadas. En la primer parte de este capítulo se discutirá la protección química de las furanosas y luego el estudio de la regioselectividad de las reacciones de desprotección utilizando diversas fuentes enzimáticas.

Una vez obtenidas las furanosas regioselectivamente desprotegidas, es decir, con la posición 5 libre, se procedió a la obtención de las diversas furanosas 5-fosfato, por lo que, en la segunda parte de este capítulo se describirán diversas estrategias de fosforilación química.

Asimismo se discutirá en este capítulo, la obtención de otros sintones, utilizando las furanosas desprotegidas en hidroxilos secundarios, como posibles precursores para la síntesis de diversas furanosas 5-fosfato.

3.2- Esquema general de la síntesis de furanosas 5-fosfato

A continuación se describe el esquema general de la síntesis quimio-enzimática de diversas furanosas 5-fosfato (**Figura 3.1**). El primer paso es la protección de todos las funciones hidroxilo de la molécula del monosacárido. La protección del hidroxilo anomérico se realizó mediante la condensación del monosacárido con un alcohol, formándose los metil o butil-pentofuranósidos correspondientes. Luego, se procedió a la protección de las demás funciones hidroxílicas mediante reacciones de acetilación, obteniéndose los alquil-furanósidos acetilados correspondientes, según se muestra en la **Figura 3.2**.

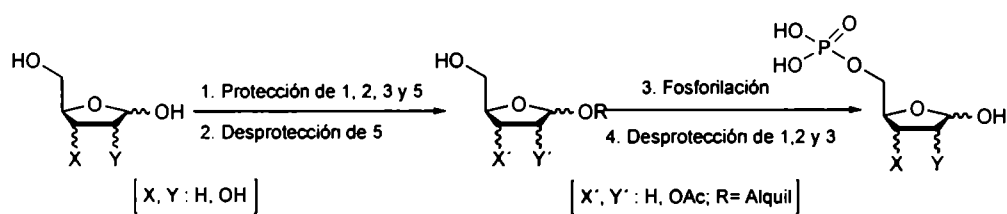


Figura 3.1. Esquema general de la síntesis de furanosas 5-fosfato.

Una vez obtenidos estos productos, se ensayaron diversas estrategias de desacetilación enzimática, utilizando dos enzimas comerciales, la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) y la lipasa inmovilizada de *Candida antártica* B (CAL-B). Asimismo, se ensayaron reacciones de desacetilación utilizando tejido vegetal (*Musa sapientum*) como biocatalizador (Figura 3.2). Una vez obtenidos los metil 2,3-*O*-diacetil pentofuranósidos se ensayaron reacciones de fosforilación química, para obtener finalmente las furanosas 5-fosfato.

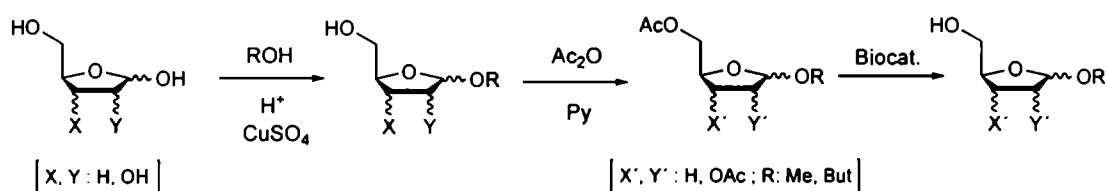


Figura 3.2. Síntesis de furanosas con la posición 5 libre

3.3- Resultados y discusión

3.3.1- Síntesis de alquil furanosidós acetilados

Como se muestra en la Figura 3.1, el primer paso de la estrategia planteada para la obtención de furanosas 5-fosfato es la protección de las funciones hidroxílicas en las diversas pentosas. En primera medida se comenzó con la protección del hidroxilo anomérico mediante una glicosidación de Fischer¹. Esta reacción implica el tratamiento de carbohidratos desprotegidos con alcoholes en presencia de un catalizador ácido. A pesar de ser el primer método de glicosidación,

¹ Ver por ejemplo: a) Fischer, E.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1893**, 26, 2400, b) Fischer, E.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1895**, 28, 1145

descrito en el año 1893, es muy útil para la síntesis de glicósidos con alcoholes simples, dado que no requiere ningún tipo de protección en los hidroxilos del azúcar. Más aun, por medio de esta reacción se pueden obtener predominantemente las formas alquil furanósidas. En general, la reacción de Fischer transcurre de forma tal, que en etapas tempranas las formas furanósicas son las predominantes (control cinético) mientras que en equilibrio las formas piranósicas son el producto mayoritario (control termodinámico)². Esto es debido a que la ciclación de anillos de cinco miembros es más veloz que la análoga de seis miembros. Cuando la reacción está gobernada por la cinética, se observaran los productos furanósicos que se equilibraran luego, a la mezcla de equilibrio termodinámica. Esta equilibración involucra una expansión del anillo a las formas piranósicas termodinámicamente más estables. Las preferencias conformacionales de las aldopentosas están gobernadas por la minimización de la repulsión estérica, y por una mayor estabilización anomérica. Por lo que si la reacción se termina en etapas tempranas, pueden aislarse como productos mayoritarios, los glicósidos furanósicos.

Con el objetivo de sintetizar diversas furanosas 5-fosfato y asimismo poder estudiar la regioselectividad de las reacciones de desacetilación en diversas furanosas acetiladas, se sintetizaron los productos *O*-metilados derivados de la D-ribosa, D-arabinosa, D-xilosa, D-desoxirribosa, y L-arabinosa. Asimismo, con el propósito de extender los estudios de regioselectividad en las reacciones de desacetilación, se sintetizaron los productos *O*-butilados derivados de la D-ribosa, D-arabinosa y D-xilosa.

Las condiciones de reacción empleadas en todos los casos para las glicosidaciones de Fischer fueron el uso del mismo alcohol (metanol o butanol, según corresponda) como disolvente, en presencia de cantidades catalíticas de ácido sulfúrico como catalizador ácido, añadiéndose cantidades equimolares de sulfato de cobre anhidro, para de esta forma capturar las moléculas de agua liberadas por la reacción de glicosidación.

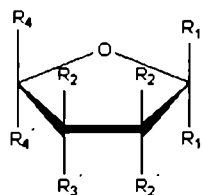
Para obtener una mayor proporción de las pentosas en la forma furanósica, se estudió la reacción de Fischer en función del tiempo de reacción, aislando pequeñas alícuotas de productos alquilados, y posteriormente analizándose los espectros de RMN de ¹H y ¹³C de los crudos de reacción. En el caso de la reacción de glicosidación de Fischer realizada sobre la D-ribosa se observó, a todos los tiempos de reacción analizados, la formación mayoritaria de metil- α -D-ribofuranósido y metil- β -D-ribofuranósido. Al evaluar la relación anomérica a distintos tiempos, se observó que a tiempos cortos de reacción (3 h) se formó únicamente el producto β glicosidado,

² Boons, G.; Hale, K.; *Organic Synthesis with Carbohydrates*, Wiley-Blackwell, 2000. ISBN: 978-1-85075-913-3

mientras que al aumentar el tiempo de la reacción, se obtuvo como producto mayoritario la mezcla de anómeros α y β en las formas furanósicas, incrementándose la proporción del anómero α en la mezcla con el tiempo de reacción. A tiempos prolongados (> 48 h) se observó la aparición, en pequeña proporción, de los productos glicosidados en la forma piranósica. Para la D-arabinosa se observó la completa conversión del sustrato a 3 horas de reacción, observándose los productos mayoritarios en las formas furanósicas, con una pequeña proporción (menor al 5%) de los análogos piranósicos. En el caso de la D-xilosa y L-arabinosa el tiempo de reacción fue crítico, observándose a tiempos mayores a 3 h, una proporción elevada de los derivados en las formas piranósicas.

Una vez confirmada la presencia de los anillos furanósicos, se continuó con la protección de los demás hidroxilos libres. Esto se llevó adelante mediante reacciones de acetilación química, utilizando anhídrido acético en piridina (Py), añadiendo cantidades catalíticas de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), directamente sobre los crudos de reacción de las glicosidaciones. En todos los casos, se pudieron purificar exitosamente por cromatografía en columna de sílica gel, los metil 2,3,5-tri-*O*-acetil-D/L-pentofuranósidos con rendimientos en un rango del 40-50%, calculados a partir del azúcar libre (Tabla 3.1). En el caso del metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-ribofuranósido (1a,b; Figura 3.3), ambos anómeros se pudieron aislar por cromatografía en columna de sílica gel, mientras que en el caso de los productos metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (2, Figura 3.3), metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-xilofuranósido (3, Figura 3.3) y metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -L-arabinofuranósido (4, Figura 3.3), se obtuvieron las mezclas de anómeros en distintas proporciones según indica la tabla 3.1. En el caso del desoxirribósido, las formas furanósicas no se pudieron aislar eficientemente de las piranósicas por métodos cromatográficos.

Utilizando la misma estrategia, se sintetizaron los butil furanósidos (Figura 3.3) con rendimientos comparables a los metil furanósidos. Se observó una única diferencia entre los productos obtenidos *O*-metilados y *O*-butilados, siendo ésta, la relación anomérica obtenida en la reacción de butilación de la D-arabinosa, observándose una gran proporción del anómero α con respecto al β (Tabla 3.1).



	R ₁	R ₁	R ₂	R ₂	R ₃	R ₃	R ₄	R ₄
1a	H	OMe	H	OAc	H	OAc	CH ₂ OAc	H
1b	OMe	H	H	OAc	H	OAc	CH ₂ OAc	H
2	(H	OMe)	OAc	H	H	OAc	CH ₂ OAc	H
3	(H	OMe)	H	OAc	OAc	H	CH ₂ OAc	H
4	(H	OMe)	OAc	H	H	OAc	H	CH ₂ OAc
5a	H	OBu ^t	H	OAc	H	OAc	CH ₂ OAc	H
5b	OBu ^t	H	H	OAc	H	OAc	CH ₂ OAc	H
6	(H	OBu ^t)	OAc	H	H	OAc	CH ₂ OAc	H
7	(H	OBu ^t)	H	OAc	OAc	H	CH ₂ OAc	H

• Los paréntesis indican la mezcla de anómeros

Figura 3.3. Alquil 2,3,5-tri-*O*-acetil-D/L-pentofuranósidos preparados

Wong y colaboradores³ estudiaron la regioselectividad de diversas reacciones de desacetilación de metilfuranósidos, utilizando la CRL como biocatalizador. En la reacción de desacetilación del metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-xilofuranósido, estos autores obtuvieron los dos anómeros desacetilados con distintas regioselectividades. En el caso del anómero β , obtuvieron el producto desprotegido en la posición 3, mientras que en el caso del anómero α , observaron el producto desacetilado en la posición 5, no logrando aislar estos productos por métodos cromatográficos usuales, obteniendo la mezcla de los anómeros desacetilados en las distintas posiciones del azúcar.

³ Hennen, W.; Sweers, H.; Wang, Y.; Wong, C.; *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 4939

Productos	$\alpha:\beta$	rend (%)
Metil 2,3,5-tri-O-acetil- α -D-ribofuranósido (1a)	-	13
Metil 2,3,5-tri-O-acetil- β -D-ribofuranósido (1b)	-	50
Metil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (2)	2:1	53
Metil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-xilofuranósido (3)	1:1	45
Metil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -L-arabinofuranósido (4)	2:1	54
Butil 2,3,5-Tri-O-acetil- α -D-ribofuranósido (5a)	-	16
Butil 2,3,5-Tri-O-acetil- β -D-ribofuranósido (5b)	-	47
Butil 2,3,5-Tri-O-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (6)	5:1	56
Butil 2,3,5-Tri-O-acetil- α,β -D-xilofuranósido (7)	1:1.3	40

Tabla 3.1. Rendimientos y proporciones anoméricas de los alquil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -pentofuranósidos.

Con objeto de estudiar la reacción de desacetilación de los xilósidos únicamente con el anómero α , se procedió a la síntesis de la 3,5-di-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**9**, **Figura 3.4**), para así estudiar la posibilidad de obtener el anómero α desacetilado en la posición 5 de forma pura. Para esto, se sintetizó, en primera instancia, el di-O-acetal tricíclico 1,2;3,5-di-O-isopropiliden xilofuranosa partiendo de la D-xilosa en acetona y ácido sulfúrico como catalizador ácido de la reacción. Siendo ésta una reacción de condensación reversible, que libera agua como subproducto, se le añadió CuSO_4 anh. para removerla del medio de reacción. Una característica interesante de los azúcares protegidos por más de un acetal cíclico es la posibilidad de experimentar hidrólisis selectiva. Siendo el grupo 1,2-O-isopropiliden más resistente a la hidrólisis ácida, se logró obtener en condiciones ácidas suaves sobre el crudo de reacción, el producto 1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**8**, **Figura 3.4**). Finalmente se acetilaron, utilizando anhídrido acético en Py, las posiciones 3 y 5 de la xilofuranosa, obteniéndose la 3,5-di-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**9**, **Figura 3.4**), con un rendimiento del 55 %, calculado a partir de la D-xilosa. La estructura del compuesto se confirmó por análisis de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , observándose un desplazamiento a campos menores de la señal correspondiente al H-3 del producto **9** (de 4.19 ppm para el compuesto **8** a 5.00 ppm para el compuesto **9**) indicando una de las posiciones de acetilación.

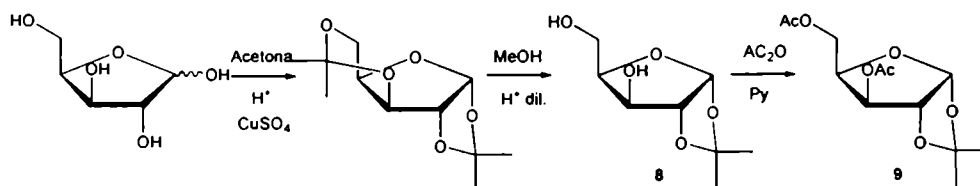


Figura 3.4. Síntesis de la 3,5-di-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa.

3.3.2 Síntesis quimio-enzimática de furanosas diacetiladas: reacciones enzimáticas de desacetilación.

Luego de la obtención de los diversos furanósidos peracetilados, se procedió al análisis de la regioselectividad de las reacciones de hidrólisis biocatalizadas utilizando enzimas de diversas fuentes, con el objeto de obtener los azúcares con la posición 5 libre. El primer biocatalizador estudiado fue la CRL. Se seleccionó este biocatalizador en base a estudios previos³ que mostraron que la reacción de hidrólisis enzimática de diversos metilfuranósidos peracetilados, era totalmente regioselectiva y se obtenían, en la mayoría de los sustratos estudiados, los productos desacetilados en la posición 5. Otro factor tenido en cuenta para su selección fue la accesibilidad comercial de este biocatalizador.

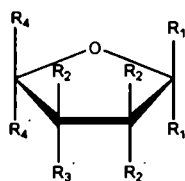
En segundo lugar, se decidió explorar la regioselectividad de las reacciones de hidrólisis enzimática utilizando tejido vegetal, como biocatalizador. Se seleccionó con este fin, porciones de *Musa sapientum* (banana) como fuente enzimática, debido a que se han reportado estudios que demuestran la presencia de lipasas y esterases en dicho fruto⁴.

Finalmente se analizó si existían diferencias en la regioselectividad de las reacciones de hidrólisis enzimática, al llevarlas a cabo sobre los sustratos butil pentofuranósidos peracetilados en lugar de los correspondientes metil derivados. Otro propósito particular de esta modificación, fue estudiar si las mezclas de anómeros obtenidas como productos de desacetilación podían separarse por métodos cromatográficos usuales.

⁴ Bailey, M.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1912**, 34, 1706

3.3.2.1- Reacciones de hidrólisis enzimática de los metil 2,3,5-tri-O-acetil-D/L-pentofuranósidos utilizando la CRL.

En términos generales, las reacciones de hidrólisis utilizando la CRL se llevaron a cabo disolviendo los sustratos peracetilados en DMF, diluyendo las soluciones posteriormente con nueve volúmenes de buffer fosfato 0,1M (pH = 7), y finalmente añadiendo la enzima comercial CRL a la mezcla de reacción y agitando orbitalmente a 37°C. De esta manera se obtuvieron reacciones homogéneas que fueron monitoreadas por c.c.d. Cuando se observaron conversiones óptimas (esto implicó como criterio tanto la máxima conversión por monitoreo de la desaparición del sustrato de partida como la menor formación de productos didesacetilados), las mezclas de reacción fueron extraídas con AcOEt, y el extracto orgánico obtenido de esta forma, fue secado y evaporado a sequedad. Los productos fueron purificados finalmente por cromatografía en columna de sílica gel. Los compuestos así obtenidos fueron analizados por RMN de ^1H y ^{13}C y posteriormente por experimentos de *homodecoupling* de ^1H . Se determinó la posición de desacetilación comparando los desplazamientos químicos de las señales de ^1H -RMN de los sustratos y de los productos. Asimismo existen algunos de estos productos asignados espectroscópicamente en publicaciones previas, confirmando la asignación de las posiciones de desacetilación propuestas.



	R ₁	R ₁	R ₂	R ₂	R ₃	R ₃	R ₄	R ₄
10 ^a	H	OMe	H	OAc	H	OAc	CH ₂ OH	H
10 ^b		OMe	H	OAc	H	OAc	CH ₂ OH	H
11	(H	OMe)	OAc	H	H	OAc	CH ₂ OH	H
12	(H	OMe)	H	OAc	OH	H	CH ₂ OAc	H
13	(H	OMe)	OAc	H	H	OAc	H	CH ₂ OH

*Los paréntesis indican la mezcla de anomeros

** Se remarcaron las posiciones de desacetilación.

Figura 3.5. Estructura de los productos de desacetilación utilizando CRL como biocatalizador.

En primer lugar, se estudió la hidrólisis de los metil 2,3,5-tri-*O*-acetil-D/L-pentofuranósidos. La hidrólisis del anómero β del metil 2,3,5-tri-*O*-acetil-D-ribofuranósido (**1b**, Figura 3.6) fue regioselectiva para la posición primaria, observándose como único producto el metil 2,3-di-*O*-acetil- β -D-ribofuranósido (**10b**, Figura 3.6) con un rendimiento del 75 % (Tabla 3.2). En el caso del anómero α , la regioselectividad fue la misma que la observada para el anómero β , obteniéndose un único producto monodesacetilado, el metil 2,3-di-*O*-acetil- α -D-ribofuranósido (**10a**, Figura 3.6) con un 80 % de rendimiento (Tabla 3.2). El análisis por RMN de los productos desacetilados de ambos anómeros, mostró un fuerte desplazamiento a campos altos de las señales correspondientes a los Hs-5, en concordancia con los datos espectroscópicos reportados previamente para ambos productos³. (de 4.11 y 4.36 ppm, señales correspondientes a cada H-5 en el sustrato **1b**, a 3.46 y 3.57 ppm en el producto **10b** y de 4.22 y 4.37 ppm señales correspondientes a cada H-5 del sustrato **1a** a 3.82 y 3.87 ppm en el producto **10a**).

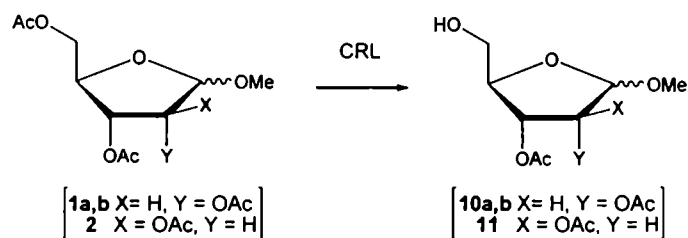


Figura 3.6. Desacetilación enzimática de metil 2,3,5-tri-*O*-acetil-D-ribo y D-arabinofuranósidos

La hidrólisis de la mezcla de anómeros del metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (**2**, Figura 3.6) también dio la regioselectividad deseada, obteniéndose la mezcla de ambos anómeros desacetilados en la posición 5 (metil 2,3-di-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranósido, **11**, Figura 3.6) con un rendimiento del 70 % (Tabla 3.2). La reacción de desacetilación del D-arabinósido peracetilado fue estudiada previamente por Wong y colaboradores³, aunque únicamente analizaron la desacetilación enzimática del anómero α utilizando la CRL, observando la misma regioselectividad que la obtenida por la reacción de hidrólisis realizada en nuestro laboratorio, razón por la cuál fue posible comparar las asignaciones espectroscópicas de ambos productos obtenidos. Para determinar la posición de desacetilación del producto obtenido por hidrólisis del anómero β , se analizaron los espectros de ¹H-RMN, en los cuales se observó un fuerte desplazamiento a campos altos de las señales correspondientes a los Hs-5 (de aprox. 4.14 y 4.20 ppm correspondientes a las señales de los H-5 del sustrato **2 β** a 3.82 y 3.79 ppm en el producto

11β), obteniéndose entonces la misma regioselectividad que en el caso del anómero α . No fue posible separar por métodos cromatografía en columna de sílica gel esta mezcla de anómeros desacetilados, pero pudo utilizarse como tal para la posterior reacción de fosforilación, ya que en ambos anómeros se encuentra desprotegida la posición 5. En los tres casos descritos, se completó la reacción de hidrólisis, obteniendo conversiones aprox. cuantitativas. Los rendimientos obtenidos menores al 100 % pueden ser atribuidos a pérdidas de masa en la extracción con acetato de etilo de la mezcla de reacción, debido a la formación de una emulsión en la interfase y a la solubilidad de los compuestos en la fase acuosa / DMF.

Sustrato	Tiempo de reacción (h)	Rend. (%)	Producto	$\alpha:\beta$
Metil 2,3,5-tri-O-acetil- α -D-ribofuranósido (1a)	11	80	5-OH (10a)	-
Metil 2,3,5-tri-O-acetil- β -D-ribofuranósido (1b)	13	75	5-OH (10b)	-
Metil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (2)	10	70	5-OH (11)	2:1
Metil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-xilofuranósido (3)	15	54	3-OH (12)	1.5:1
Metil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -L-arabinofuranósido (4)	15	50	5-OH (13)	4:1

Tabla 3.2 Desacetilación regioselectiva de metilfuranósidos peracetilados utilizando CRL.

La hidrólisis de la mezcla anomérica del metil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-xilofuranósido (**3**, **Figura 3.7**) dio como resultado dos productos en una relación de 1.5:1. Ambos productos fueron parcialmente aislados por cromatografía en columna de sílica gel e identificados por espectroscopia de RMN de ^1H . En este caso, la regioselectividad observada no coincidió con la obtenida en el caso de los ribósidos, obteniéndose los productos desacetilados en la posición 3 con un 54 % de rendimiento (**Tabla 3.2**). En el trabajo de Wong y colaboradores³, se reportó la obtención del mismo producto desacetilado en la posición 3 en el caso del anómero β (metil 2,5-di-O-acetil- β -D-xilofuranósido (**12β**, **Figura 3.7**), pero en cambio se informó que el producto obtenido por la hidrólisis enzimática del anómero α era el desacetilado en la posición 5, no pudiendo aislar la mezcla anomérica por cromatografía en columna de sílica gel. En el último caso, los espectros de ^1H y ^{13}C reportados en esta publicación, no coinciden con los obtenidos a partir del producto aislado en la reacción de hidrólisis realizada en nuestro laboratorio. El producto asignado y verificado por experimentos de *homodecoupling* de ^1H , fue el producto desacetilado en la posición 3, el metil 2,5-di-O-acetil- α -D-xilofuranósido (**12α**, **Figura 3.7**). En este caso se observó en el espectro de RMN de ^1H , un desplazamiento de la señal correspondiente al H-3 (de 5,49 ppm para el sustrato triacetilado **3α** a 4.49 ppm para el producto de hidrólisis **12α**).

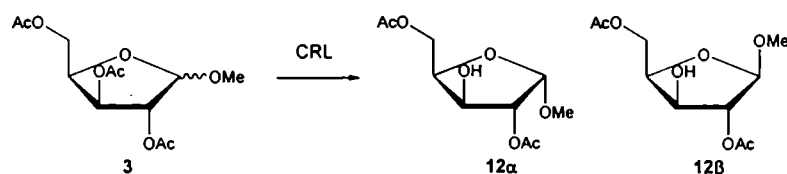


Figura 3.7. Desacetilación enzimática de metil 2,3,5-tri-*O*-acetil-D-xilofuranósido.

Por último, la hidrólisis utilizando la CRL como biocatalizador, de la mezcla de anómeros metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -L-arabinofuranósido (**4**, Figura 3.3), se produjo con la regioselectividad deseada, obteniéndose el producto desacetilado en la posición 5 del azúcar, el metil 2,3-di-*O*-acetil- α,β -L-arabinofuranósido (**13**, Figura 3.5) con un 50 % de rendimiento (Tabla 3.2). En concordancia con los productos desacetilados en la posición 5, se observó en el RMN de ^1H , un desplazamiento a campos más altos de las señales correspondientes a dichos hidrógenos (se observó un multiplete en el rango de 4,05-4,20 ppm correspondientes a los H-5 en el sustrato, mientras que las señales correspondientes al H-5 en el producto desacetilado, se observaron en el rango de 3,77-3,79 ppm).

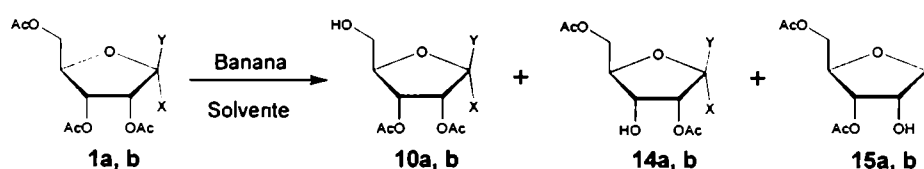
En las dos últimas hidrólisis descritas se obtuvieron rendimientos alrededor de 50 %, debido a que no se pudieron completar ambas reacciones. A tiempo mayores a 15 horas comenzaron a aparecer productos monoacetilados, por lo que se concluyeron las reacciones a tiempos óptimos, en los cuales la conversión no fue cuantitativa. Se puede observar que en todos los casos estudiados, el anómero α reacciona con mayor velocidad que el anómero β correspondiente, en las reacciones de hidrólisis. Esta observación se pudo deducir, comparando la relación anomérica en el producto desacetilado con respecto a la relación anomérica en el material de partida. Asimismo se comprobó que el material de partida sin reaccionar, era el metil β -pentofuranósido triacetilado.

3.3.2.2- Reacciones de hidrólisis enzimática de los metil 2,3,5-tri-O-acetil-D/L-pentofuranósidos utilizando tejido vegetal (*Musa sapientum*)

Las reacciones de hidrólisis utilizando tejido vegetal, particularmente porciones de banana, como fuente de lipasas y estererasas, se llevaron a cabo primero disolviendo los sustratos peracetilados tanto en DMF como en AcOEt, diluyendo las soluciones posteriormente con nueve volúmenes de buffer fosfato 0,1M (pH=7), finalmente añadiendo las porciones de banana pretratadas a la mezcla de reacción, y agitando a 37°C en un agitador orbital. Se utilizó para estos ensayos banana de origen ecuatoriano (*Musa sapientum*, variedad Cavendish). El pretratamiento del biocatalizador implicó, en primer lugar, cortar la banana comercial en cubos con volúmenes menores a 1 cm³, para luego lavarlos sucesivamente con una solución acuosa de lavandina 1 %, agua destilada, etanol y finalmente agua destilada nuevamente, para de esta forma eliminar posibles microorganismos superficiales que pudiera contener el tejido vegetal. Finalmente se dejó equilibrar las porciones de banana con el buffer de reacción. Antes de ser añadidas se cuantificó el coeficiente de maduración⁴, que aproximadamente fue de 1,8 en todos los casos estudiados, ya que el contenido de las distintas enzimas puede variar a lo largo del proceso de maduración⁵. Las reacciones fueron monitoreadas por c.c.d., y cuando se observaron conversiones óptimas, las mezclas de reacción fueron centrifugadas, y luego extraídas con AcOEt, el extracto orgánico obtenido de esta forma, fue secado con Na₂SO₄ anhidro, filtrado y evaporado a sequedad. Los productos fueron purificados finalmente por cromatografía en columna de sílica gel y analizados por RMN de ¹H y ¹³C y por *homodecoupling* de ¹H. Se determinó la posición de desacetilación comparando los desplazamientos químicos de las señales de ¹H-RMN de los sustratos y productos. Paralelamente se llevaron a cabo experimentos blancos en ausencia del biocatalizador.

En primer lugar se estudió la reacción de hidrólisis del metil 2,3,5-tri-O-acetil- α -D-ribofuranósido (**1a**, **Figura 3.8**) utilizando porciones de banana pretratadas como biocatalizador. Las reacciones fueron seguidas por c.c.d hasta desaparición completa del sustrato **1a**. Se exploraron dos condiciones experimentales: En primera instancia, se utilizó una mezcla de DMF y buffer fosfato pH=7.0 como solvente³, condición idéntica a la utilizada para las reacciones de hidrólisis utilizando CRL como biocatalizador, descrita en la sección 3.3.2.1. El RMN de ¹H del crudo de reacción (**Figura 3.9A**) indicó la presencia de un único producto de hidrólisis (72 % de rendimiento, solo un carbono anomérico), en el que se observó un fuerte desplazamiento a campos altos de las señales correspondientes a los Hs-5, en concordancia con los datos

espectroscópicos reportados previamente para el metil 2,3-di-*O*-acetil- α -D-ribofuranósido (**10a**, Figura 3.8). Posteriormente se modificaron las condiciones experimentales, utilizando como solvente de reacción, la mezcla de AcOEt : buffer fosfato pH = 7.0, de forma de simplificar el proceso de tratamiento de los productos. En este caso se observó la misma regioselectividad en la reacción de hidrólisis, obteniéndose como único producto el metil 2,3-di-*O*-acetil- α -D-ribofuranósido (**10a**, Figura 3.8) esta vez con un rendimiento cuantitativo. La mejora en los rendimientos de reacción puede ser atribuida a extracciones líquido-líquido más eficientes que las correspondientes para el sistema de solventes DMF : buffer fosfato.



X	Y	Comp.	Solvente	Relación Molar 10 : 14 : 15	Conv. % ^b	Rend. % ^c	tiempo de reacción (hs)
OCH ₃	H	a	DMF:PBS ^a	1 : 0 : 0	100	72	11
OCH ₃	H	a	AcOEt:PBS	1 : 0 : 0	100	99	11
H	OCH ₃	b	DMF:PBS	1 : 1 : 1	83	43	13
H	OCH ₃	b	AcOEt:PBS	1 : 1 : 1	85	54	12

^a PBS: Buffer fosfato pH = 7. ^b Conversion %: determinado utilizando el balance de masa de los productos aislados por cromatografía. ^c Rendimiento % luego de la purificación por cromatografía en columna de sílica gel. (excepto por el compuesto **10a** para el cual no fue necesaria).

Figura 3.8. Reacción de desacetilación del metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α -D-ribofuranósido y metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- β -D-ribofuranósido, utilizando trozos de banana como biocatalizador.

Cuando la reacción de hidrólisis fue llevada a cabo sobre el sustrato metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- β -D-ribofuranósido (**1b**, Figura 3.8) se observó una desprotección no regioselectiva. En este caso se obtuvo una mezcla equimolar de los tres posibles productos de monodesacetilación, el metil 2,3-di-*O*-acetil- β -D-ribofuranósido (**10b**, Figura 3.8), el metil 2,5-di-*O*-acetil- β -D-ribofuranósido (**14b**, Figura 3.8) y el metil 3,5-di-*O*-acetil- β -D-ribofuranósido (**15b**, Figura 3.8). Este resultado se confirmó espectroscópicamente (Figura 3.9B) observándose un conjunto de tres señales diferentes en el RMN de ¹H, correspondientes a los tres Hs-1 (4.86, 4.87 y 4.92 ppm) que correlacionan con las tres señales anoméricas diferentes observadas en el RMN de ¹³C (105.86, 106.39 y 108.42 ppm). La mezcla de isómeros se observó como una única mancha en c.c.d con el mismo R_f que el compuesto **10b**, indicando el mismo grado de desacetilación.

Aunque se ha reportado anteriormente que los sustratos **1a** y **1b** exhibían el mismo comportamiento regioselectivo en las reacciones de hidrólisis utilizando CRL, los resultados obtenidos en este caso sugieren que la estereoquímica del centro anomérico podría afectar la selectividad de la reacción de desacetilación enzimática cuando se utilizan porciones de banana como biocatalizador. En consonancia con estos resultados, se ha recientemente reportado⁵ que la alcoholisis enzimática utilizando la CAL-B muestra un patrón de reconocimiento diferente hacia los anómeros **1a** y **1b**.

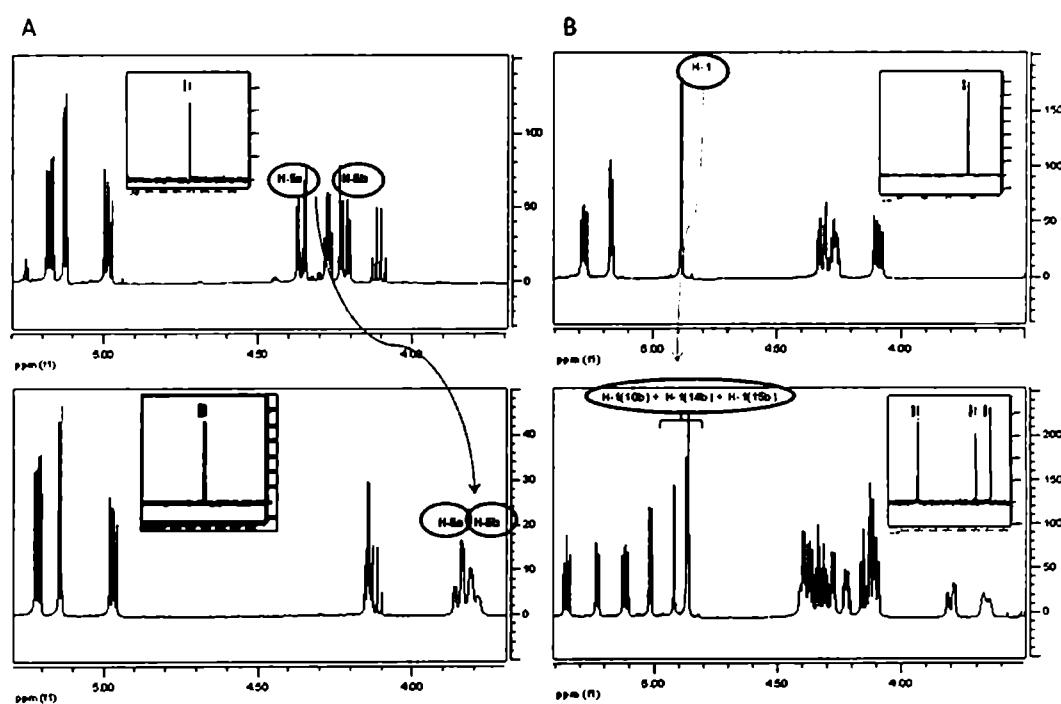
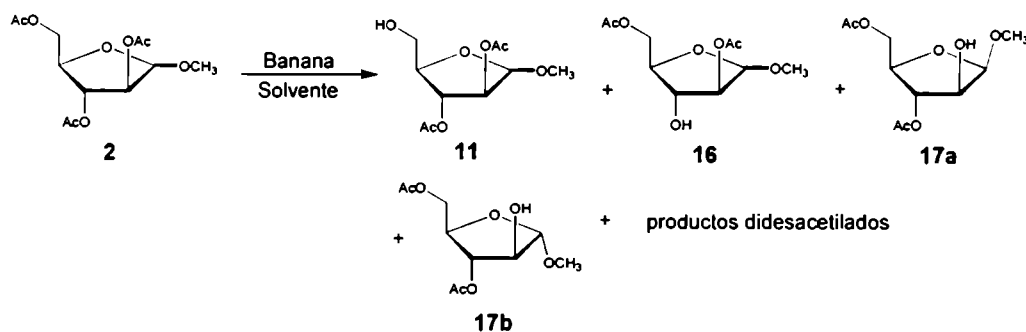


Figura 3.9. Espectros de RMN de ^1H del crudo de reacción de las hidrólisis enzimáticas utilizando banana como biocatalizador: (A) partiendo del sustrato **1a**, (B) partiendo del sustrato **1b**.

Con el objeto de explorar si el fenómeno de regioselectividad observado al utilizar porciones de banana como biocatalizador era de carácter general, se estudió la reacción de desacetilación utilizando este biocatalizador, de la mezcla anomérica de relación $\alpha:\beta$ de 2:1, del sustrato metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (**2**, Figura 3.10). Las condiciones experimentales ensayadas fueron las mismas que las empleadas para las reacciones análogas realizadas sobre los sustratos ribosídicos (DMF:Buffer fosfato pH=7, 37°C). Se analizaron, en este

⁵Iñigo, S.; Taverna-Porro, M.; Montserrat, J.; Iglesias, L.; Iribarren, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2005, 35 70

caso, las reacciones de desprotección a diversos grados de conversión. A conversiones del 45 % (Figura 3.10) se obtuvieron sólo los productos diacetilados: metil 2,3-di-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (**11**, Figura 3.10), metil 2,5-di-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (**16**, Figura 3.10), y metil 3,5-di-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (**17**, Figura 3.10), con un relación molar de 1:1:7. El componente mayoritario fue asignado como la mezcla de anómeros en relación $\alpha:\beta$ 1:1.2 del producto desacetilación en la posición 2 del azúcar. La comparación de los RMN de la mezcla cruda de reacción y los de la fracción aislada cromatográficamente, sugiere que no ocurrió migración del grupo acetilo durante la purificación. En un experimento independiente cuando la reacción alcanzó un 87 % de conversión (Figura 3.10), se aisló la mezcla de los tres posibles productos de monodesacetilación, **11**, **16** y **17**, en una relación molar 2.6 : 2.1 : 5.3. En este caso, la relación de anómeros del producto mayoritario se vio modificada, obteniéndose una relación $\alpha:\beta$ de 1 : 0.04. Asimismo, se aisló una fracción de productos didesacetilados con un 45 % de rendimiento, productos de desacetilaciones sucesivas del anómero β . Estos resultados contrastan con el comportamiento del ribósido **1a** en las reacciones de hidrólisis utilizando porciones de banana como biocatalizador, que pudo ser convertido cuantitativamente al producto diacetilado (**10a**) sin posteriores y sucesivas desacetilaciones.



Solvente	Relación Molar 11 : 16 : 17 (17a : 17b)	Conv. % ^b	Rend. Monodesacet. % ^c	Rend. Didesacet %	tiempo de reacción (hs)
DMF:PBS ^a	1 : 1 : 7 (1 : 1.2)	45	25	0	10
DMF:PBS	2.6 : 2.1 : 5.3 (1 : 0.04)	87	17	45	16
AcOEt:PBS	1 : 1 : 8 (1 : 1.1)	50	27	0	10
AcOEt:PBS	1.7 : 2.8 : 5.6 (1 : 0.18)	100	14	64	16

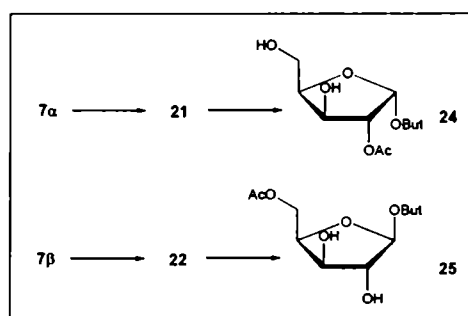
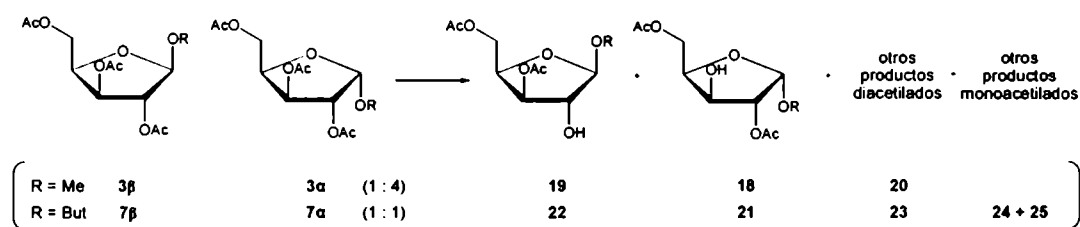
^a PBS: Buffer fosfato pH = 7. ^b Conversión % determinado utilizando el balance de masa de los productos aislados por cromatografía. ^c Rendimiento %: luego de la purificación por cromatografía en columna de sílica gel.

Figura 3.10. Reacción de desacetilación del metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-arabinósido, utilizando banana como biocatalizador.

Cuando las condiciones de reacción se modificaron como se describió para el caso de los ribósidos, utilizando la mezcla AcOEt : bufer fosfato pH 7.0 como solvente, la reacción de hidrólisis utilizando porciones de banana como biocatalizador, dio resultados similares a los obtenidos utilizando la mezcla DMF : buffer fosfato pH 7.0 (**Figura 3.10**). En ambos casos, cuando fue incrementado el grado de conversión de la reacción, se vio aumentado el rendimiento de los productos didesacetilados, principalmente por la hidrólisis del anómero β del compuesto **17**, cambio reflejado en la proporción de los anómeros de dicho compuesto con el grado de conversión (**Figura 3.10**).

Cuando la reacción de hidrólisis utilizando banana como biocatalizador, se llevó a cabo sobre el sustrato metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -L-arabinofuranósido (**4**), se obtuvieron los tres posibles productos de monodesacetilación en proporción equimolar, en todos los grados de conversión ensayados, concluyéndose así, que la reacción no mostró regioselectividad cuando se realizó sobre este sustrato.

Por otro lado, la reacción de hidrólisis llevada a cabo sobre el metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-xilofuranósido (**3**, **Figura 3.11**) utilizando el mismo biocatalizador, mostró como en el caso de los ribósidos, diferentes regioselectividades dependiendo de la configuración del C-1. Cuando se sometió a hidrólisis enzimática dicho sustrato (**3**, $\alpha:\beta$ 4:1) utilizando como solvente de reacción, la mezcla DMF : Buffer fosfato pH=7.0, se obtuvo una mezcla de productos que consistía en dos compuestos diacetilados, que fueron asignados espectroscópicamente como: metil 2,5-di-*O*-acetil- α -D-xilofuranósido (**18**, **Figura 3.11**) y metil 3,5-di-*O*-acetil- β -D-xilofuranósido (**19**, **Figura 3.11**) en una relación molar 5.3 : 3.8, junto con aproximadamente 10 % de otros productos de didesacetilación (**20**, **Figura 3.11**). Cuando la misma reacción se llevó a cabo alcanzando mayores grados de conversión (grado de conversión del 86 %, **Figura 3.11**), fueron aislados ambos productos monodesacetilados (**18** y **19**, **Figura 3.11**) con menores rendimientos, lo cuál puede ser atribuido a las subsiguientes reacciones de hidrólisis. Al ser imposible de separar por métodos cromatográficos utilizando sílica gel esta mezcla anomérica de productos diacetilados en distintas posiciones del azúcar, se ensayó la reacción de hidrólisis sobre un sustrato de mayor lipofilia. Con este objetivo se sintetizó el butil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-xilofuranósido, cuya reacción de hidrólisis se describe en la próxima sección.



sustrato	R	Conv. %	Rend. Monodesacet. %	Rend. Didesacet. %	18 : 19 : 20	21 : 22 : 23 : 24+25 ^a
3 (α,β)	Me	65	42	0	5.3 : 3.8 : 1.1	-
3 (α,β)	Me	86	29	0	6.2 : 2.5 : 1.3	-
7 (α,β)	But	76	40	28	-	2.2 : 3.4 : 0.2 : 4.2
7 (α,β)	But	95	8	51	-	0.52 : 0.84 : 0.04 : 8.6

^a a productos monoacetilados como una mezcla de anómeros.

Figura 3.11. Reacción de desacetilación del metil 2,3,5-tri-O-acetil-α,β-D-xilósido y Butil 2,3,5-tri-O-acetil-α,β-D-xilósido, utilizando banana como biocatalizador.

3.3.2.3- Reacciones de hidrólisis enzimática de los butil 2,3,5-tri-O-acetil-D-pentofuranósidos utilizando tejido vegetal (trozos de banana)

Con el objeto de separar la mezcla de anómeros obtenida en la reacción de hidrólisis utilizando porciones de banana como biocatalizador del derivado xilósido, se planteó la síntesis de sustratos más lipofílicos, de forma de lograr aislar los citados epímeros, por métodos cromatográficos sencillos. Con este fin, se sintetizaron los butil 2,3,5-tri-O-acetil-α,β-D-xilofuranósidos como se describe en la sección 3.3.3.1. En forma similar se prepararon los butil derivados de la D-ribosa y de la D-arabinosa. La hidrólisis enzimática de los derivados butilados de la D-ribosa y D-arabinosa dio la misma regioselectividad que la obtenida para el caso de los metil

derivados, observándose que en el caso del butil 2,3,5-tri-*O*-acetil- β -D-ribofuranósido la mezcla equimolar de los tres productos posibles de desacetilación y en el del butil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α -D-ribofuranósido, el producto desacetilado en la posición 5. En el caso del butil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranósido se vio disminuida la regioselectividad de la reacción, observándose mezclas de los productos de desacetilación cuasi equimolares, inclusive a grados de conversión pequeños.

Cuando la reacción de hidrólisis enzimática fue llevada a cabo sobre la mezcla anomérica de los butil 2,3,5-di-*O*-acetil- α,β -D-xilofuranósidos (**7**, **Figura 3.11**), se obtuvieron, luego de la purificación, dos fracciones de productos diacetilados con un rendimiento total del 40 %, a un grado de conversión del 76 %. La primera fracción estaba compuesta por los dos productos de desacetilación: el butil 2,5-di-*O*-acetil- α -D-xilofuranósido (**21**, **Figura 3.11**) y el butil 3,5-di-*O*-acetil- β -D-xilofuranósido (**22**, **Figura 3.11**) en una relación molar $\alpha:\beta$ de 2.2 : 3.4. La segunda fracción, aislada cromatográficamente contenía únicamente el anómero β diacetilado en forma pura. La obtención del anómero puro facilitó la asignación espectroscópica de las posiciones de desacetilación por análisis de RMN (**Figura 3.12**). Para el compuesto **22** se observó un claro desplazamiento en las señales de RMN de ^1H del H-2 (de 5,6 ppm para el compuesto **7 β** a 4.55 ppm para el compuesto **22**, círculo negro en la **Figura 3.12**), sugiriendo que la desprotección ocurrió sobre dicha posición. Para el compuesto **21** se observó un desplazamiento en las señales de RMN de ^1H del H-3 (de 5.13 ppm en el compuesto **7 α** a 4.20 ppm en el compuesto **21**) indicando la posición del acetilo hidrolizado. Se analizó luego, la fracción de los productos didesacetilados, cuando la conversión fue del 95 %, y el rendimiento de los productos monoacetilados fue del 51 % (**Figura 3.11**). Por análisis de RMN (C-1: 107.34 y 98.83 ppm, H-1: 5.21 ppm (doblete) y 4.97 ppm (singulete)) fue posible establecer que la mezcla estaba compuesta por ambos anómeros didesacetilados en una relación de 1 : 1 (**Figura 3.12**). Basados en experimentos de *homodecoupling* de la mezcla, se confirmó la identidad de ambos productos de didesacetilación, determinando que dicha mezcla contenía el butil 2-*O*-acetil- α -D-xilofuranósido (**24**, **Figura 3.11**) y el butil 5-*O*-acetil- β -D-xilofuranósido (**25**, **Figura 3.11**).

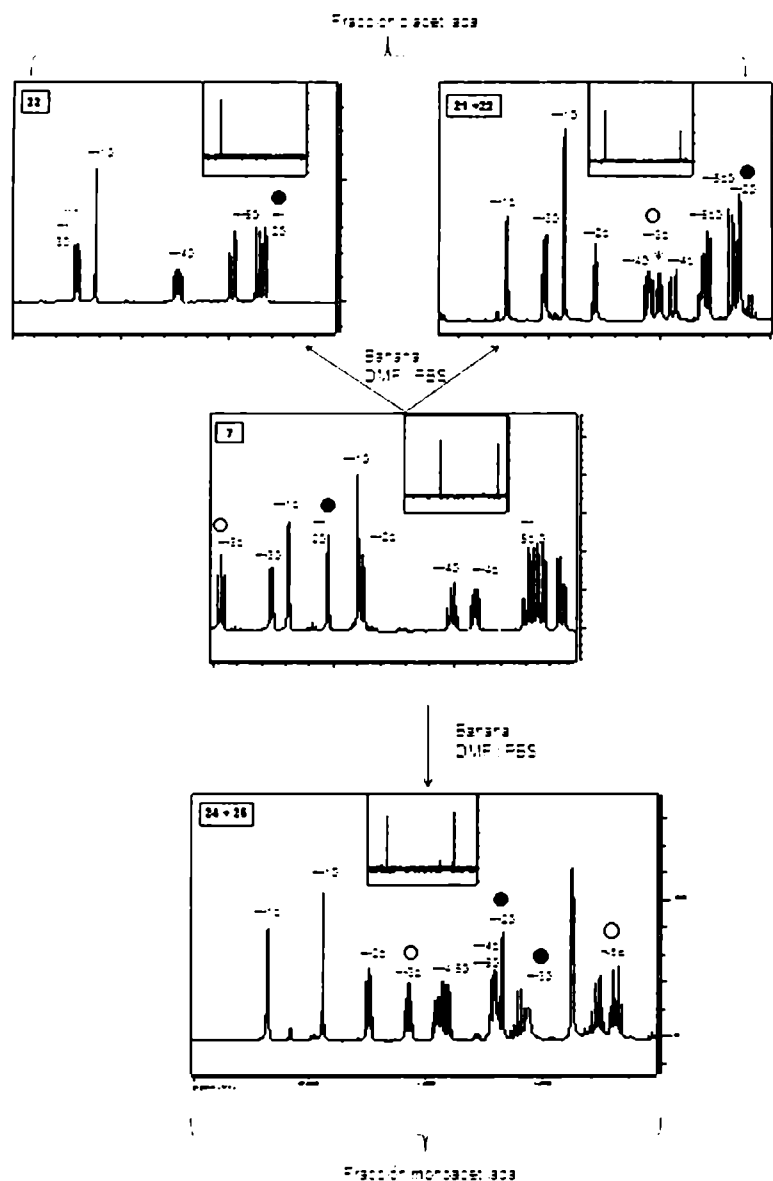


Figura 3.12 Espectro de RMN de los productos de mono y di desacetilación obtenidos por la reacción de hidrólisis del butil 2,3,5-tri-O-acetil- α,β -D-xilósido, utilizando banana como biocatalizador.

En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **24** se observó un claro desplazamiento a campos más altos (círculos blancos, **Figura 3.12**) en las señales de los H-3 y H-5 (desplazamientos de 0.78 y 0.50 ppm respectivamente), mientras que en el espectro correspondiente del compuesto **25**, el desplazamiento a campos mayores (círculo negro, **Figura 3.12**) fue asociado a los H-2 y H-3 (desplazamientos de 0.94 y 0.84 ppm, respectivamente).

3.3.2.4- Reacciones de hidrólisis enzimática de la 3,5-di-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa utilizando diversas fuentes enzimáticas.

Como se reportó en el trabajo publicado por Wong y colaboradores, que el anómero α del metil xilósido peracetilado daba el producto desacetilado en la posición 5 del azúcar, sumada la dificultad de aislar completamente los anómeros α y β monodesacetilados, productos de las reacciones de hidrólisis con diversas fuentes enzimáticas, se procedió a estudiar las reacciones de desacetilación del anómero α puro. Para esto se sintetizó la 3,5-di-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**9**, Figura 3.13). La formación del acetal cíclico precisa del hidroxilo anomérico en la orientación α , lográndose de esta forma preparar un derivado acetilado epiméricamente puro. Se ensayaron las reacciones de hidrólisis utilizando los biocatalizadores estudiados previamente: la CRL y porciones de banana. Por otra parte, se estudio la reacción de desacetilación con otra enzima, CAL-B. Esta enzima ha sido utilizada anteriormente en nuestro laboratorio, ensayándose la regioselectividad de la reacción de hidrólisis sobre los sustratos metil peracetilados, estudiados en esta tesis⁶.

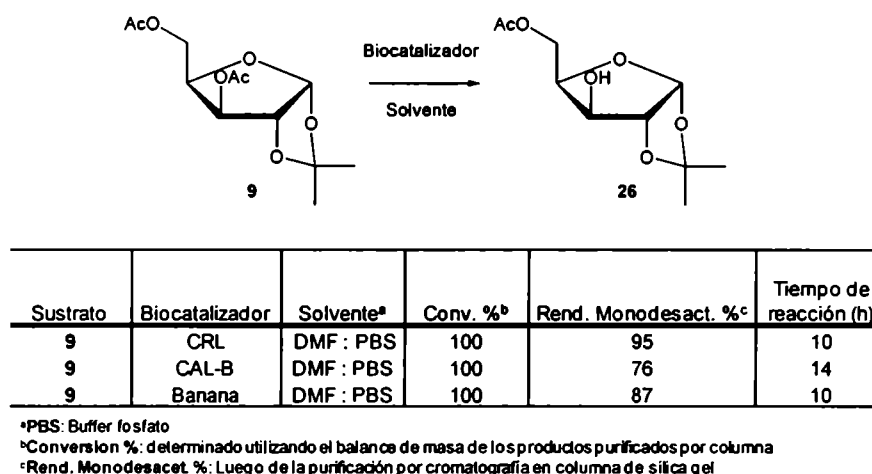


Figura 3.13. Reacción de desacetilación de la 3,5-di-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa, utilizando diversas fuentes enzimáticas como biocatalizadores.

⁶ Gudiño, E.; Iribarren, A.; Iglesias, L.; *Tetrahedron: Asymm.*, 2009, 20, 1813

Las reacciones de hidrólisis utilizando los tres sistemas enzimáticos previamente enumerados brindaron el mismo producto de desacetilación, el 5-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**26**, **Figura 3.13**). Luego de la purificación en columna de sílica gel se obtuvieron los rendimientos indicados en la **Figura 3.13**. Los productos fueron asignados por RMN de ^1H y ^{13}C , observándose en todos los casos un desplazamiento a campos más altos de la señal de ^1H correspondiente al H-3 (de 5,01 ppm para el compuesto **9** a 4.13 ppm para el compuesto **26**, círculo azul en la **Figura 3.14**), indicando la posición de desacetilación en la reacciones de hidrólisis. Se decidió, paralelamente, analizar por RMN los crudos de reacción, con el objeto de estudiar si las condiciones ácidas de la columna de sílica gel utilizada para la purificación, favorecían la migración del grupo acetilo con el fin de analizar si la regioselectividad observada en todos los casos estudiados, se debía a un artefacto producido por la posterior purificación o si reflejaba la regioselectividad de las enzimas estudiadas.

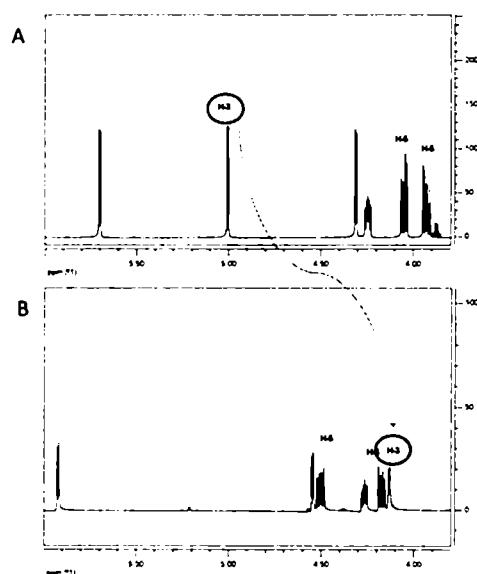
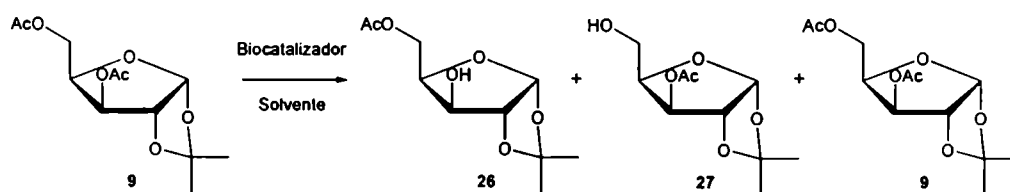


Figura 3.14. Espectro de RMN de ^1H de A) 3,5-di-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa B) 5-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa

En todos los casos estudiados se observaron que los crudos de reacción consistían en una mezcla de productos en distintas proporciones. En la reacción de hidrólisis del sustrato utilizando CRL como biocatalizador la mezcla de productos se componía de la 5-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**26**, **Figura 3.15**), la 3-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**27**, **Figura 3.15**) y el producto de partida sin reaccionar 3,5-di-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**9**, **Figura 3.15**) en una proporción 6.3 : 1 : 3. El espectro de ^{13}C -RMN del crudo de reacción mostró

tres señales correspondientes al C anomérico (104.86, 104.85 y 104.67 ppm) en las distintas proporciones. En el espectro de ^1H -RMN, se observaron dos conjuntos de señales, a 5.25 y 5.21 ppm, correspondientes a los Hs-3 pertenecientes al producto de partida sin reaccionar (**9**) y al producto desacetilado en la posición 5 (**27**). Por último se observó un conjunto de señales a 3.80 y 3.65 ppm pertenecientes a las señales de los Hs-5 del producto desacetilado en dicha posición (**27**), sumado a las señales antes descritas para el compuesto **26**. Para confirmar esta suposición se evaluó la presencia de grupos acetilos, en la zona cercana a los 2 ppm, observándose cuatro singuletes en dicha región, dos que integraban para la misma cantidad de hidrógenos, siendo los acetilos del producto de partida sin reaccionar, y dos singuletes en distintas proporciones, que serían los acetilos pertenecientes a los dos productos monodesacetilados.



Sustrato	Biocatalizador	Solvente	26 : 27 : 9
9	CRL	DMF : PBS	6.3 : 1 : 3
9	CAL-B	DMF : PBS	1 : 2.6 : 4.7
9	Banana	DMF : PBS	7.9 : 1 : 2.7

Figura 3.15. Análisis de los crudos de reacción obtenidos por la reacción de desacetilación de la 3,5-di-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa, utilizando diversas fuentes enzimáticas como biocatalizadores.

El análisis de los espectros de RMN del crudo de la reacción de hidrólisis utilizando banana como biocatalizador, indicó la presencia de los mismos componentes de la mezcla, los compuestos **26**, **27** y **9** (Figura 3.15) en una relación 7.9 : 1 : 2.7, siguiendo el análisis de RMN descripto para el realizado al crudo de la reacción de hidrólisis utilizando CRL como biocatalizador. Por último se analizó el espectro de RMN del crudo de reacción de la reacción de desacetilación utilizando CAL-B como biocatalizador, hallándose la misma composición que la determinada para los dos casos anteriores. Sin embargo la relación de los productos obtenidos se vio modificada, encontrándose una relación de los compuestos **26** : **27** : **9** de 1 : 2.6 : 4.7, siendo el producto mayoritario el desprotegido en la posición 5.

Se puede concluir que las reacciones de hidrólisis con todos los biocatalizadores ensayados no son regioselectivas cuando se realizan sobre el sustrato 3,5-di-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa, obteniéndose luego de las mismas una mezcla de los dos posibles productos de desacetilación en diversas proporciones. La obtención de un único producto, luego de la purificación por cromatografía en columna de sílica gel, pudo ser debido a la migración del grupo acetilo de la posición 3 a la 5, favorecida en medio ácido.

3.3.3- Síntesis del precursor del 3-amino-3-desoxi-D-ribofuranosa 5-fosfato y 3-azido-3-desoxi-D-ribofuranosa 5-fosfato utilizando el producto de la hidrólisis enzimática de la 3,5-di-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa.

Con el objetivo de explorar los posibles usos de los productos obtenidos mediante las reacciones de hidrólisis enzimática, en los cuales, no se obtuvo la desprotección del hidroxilo primario, se planteó la síntesis de un sintón de fosfatos de furanosas modificadas en la posición 3 del anillo furanósico. Con este objetivo, se decidió utilizar el producto de hidrólisis de la 3,5-di-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**9**, **Figura 3.13**), la 5-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden-5-*O*-acetil- α -D-xilofuranosa (**26**, **Figura 3.13**). En esta sección se discutirá la síntesis de un posible precursor de los compuestos 3-amino-3-desoxi-D-ribofuranosa 5-fosfato y 3-azido-3-desoxi-D-ribofuranosa 5-fosfato. Estos productos son de interés farmacológico debido a que los 3-amino y 3-azido-3-desoxinucleósidos son conocidos inhibidores de diversas polimerasas e inhibidores de la síntesis de proteínas.

3.3.3.1- Análisis retrosintético

El primer desafío en la síntesis de los azúcares 3-amino y 3-azido es la incorporación del grupo nitrogenado con la configuración apropiada en la posición 3 del monosacárido. Uno de los métodos más empleados para la introducción de los grupos funcionales azido y amino, es la sustitución nucleofílica de un grupo saliente apropiado con nucleófilos que contengan nitrógeno. Estas reacciones proceden con inversión de la configuración. Por lo que, si la reacción de desplazamiento se realiza sobre la posición 3 de una xilosa, se pueden obtener los derivados D-ribosídicos(**b-c**, **Figura 3.16**).

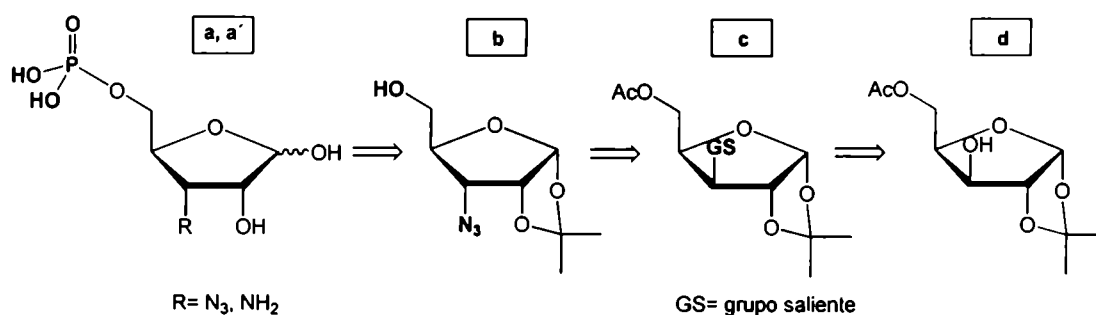


Figura 3.16. Análisis sintético para la obtención de los azúcares 5-fosfatos modificados en la posición 3

Como es ampliamente conocido, los factores que afectan las reacciones de desplazamiento nucleofílico son: el solvente de reacción, la naturaleza del grupo saliente, el tipo de nucleófilo y la estructura del sustrato. Estos factores se tuvieron en cuenta a la hora de decidir las condiciones de reacción necesarias para el éxito de la reacción de desplazamiento. Generalmente, para favorecer las reacciones de sustitución se utilizan solventes polares apróticos, por lo que se seleccionó el solvente DMF para dicha reacción. En nuestro caso se requiere obtener un azido o amino derivado secundario. En general, los grupos salientes comúnmente utilizados para las reacciones de desplazamiento de grupos secundarios son los tosilatos, mesilatos o triflato. Los dos primeros son de similar reactividad y pueden ser obtenidos de forma sencilla y económica, mediante el tratamiento del alcohol con los correspondientes cloruros de sulfonilo. Asimismo son de elevada estabilidad y de fácil manipulación. Los triflato son de mayor reactividad pero de elevado costo y más difíciles de manipular que los anteriores. Otro grupo ampliamente utilizado es el imidazolsulfonato, que comparte las propiedades de los mesilatos y tosilatos, pero posee una reactividad superior, comparable al grupo saliente triflato.

Se decidió explorar las reacciones de desplazamiento nucleofílico, utilizando azida sódica como nucleófilo y ensayando dos grupos salientes de creciente reactividad: el *p*-toluensulfonato y el imidazolsulfonato correspondiente. Se ensayaron ambos grupos teniendo en cuenta la estructura del sustrato. Debido a la configuración del azúcar y a los sustituyentes que contiene el mismo, el nucleófilo puede experimentar interacciones dipolares y estéricas desfavorables, por lo que se podrían favorecer los procesos de β -eliminación en lugar de los de sustitución nucleofílica.

Un grupo saliente mas reactivo permitiría llevar a cabo las reacciones de sustitución a menores temperaturas, favoreciéndola sobre las correspondientes de β -eliminación.

Una vez obtenido la 5-O-acetil-3-azido-3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa se planteó como paso siguiente la desprotección de la posición 5 del azúcar. Ésta puede llevarse a cabo por hidrólisis selectiva en medio básico. Con la posición 5 libre, es posible sintetizar el derivado 5-fosfato mediante reacciones de fosforilación química. Una vez obtenido el fosfato se sugirió como último paso, la desprotección de todos los grupos protectores, para así poder obtener el 3-azido-3-desoxi-D-ribosa 5-fosfato. Para obtener el 3-amino correspondiente, se planeó la posibilidad de reducir el grupo azido al amino correspondiente con hidrógeno molecular en presencia de un catalizador adecuado.

3.3.3.2- Síntesis del 3-azido-3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-ribofuranosa 5-difenilfosfato (33)

En primer lugar se procedió a la síntesis de los sustratos modificados con el grupo saliente en la posición 3. El primer sustrato sintetizado fue la 5-O-acetil-1,2-O-isopropiliden-3-O-(p-toluensulfonil)- α -D-xilofuranosa (**28a**, **Figura 3.17**). Para lo cual, se trató la 5-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**10**, **Figura 3.17**) con cloruro de p-toluensulfonilo (p-TsCl) en exceso de Py. Esta reacción procedió con bajos rendimientos, inclusive a tiempos largos de reacción (72 h). Esto pudo deberse principalmente a dos motivos: el primero es la pérdida del tosilato por el cloruro correspondiente. Se ha reportado en publicaciones previas, que el producto secundario formado, PyHCl, puede actuar en las reacciones de tosilación a su vez como nucleófilo (Cl⁻), disminuyendo el rendimiento de la reacción⁷. Otro motivo pudo ser la baja reactividad del alcohol secundario. Para mejorar el rendimiento de la tosilación, se decidió activar el grupo hidroxilo mediante el empleo de una base fuerte aprótica. La base empleada fue BDDDP. Además se reemplazó el solvente Py, por THF. Se describen a continuación, las condiciones que brindaron el mayor rendimiento del derivado tosilado: se disolvió la 5-O-acetil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa en THF, y se añadió posteriormente la base BDDDP (1 equiv.) y Py (4 equiv.) bajo atmosfera de nitrógeno. Luego se añadió el p-TsCl. La reacción se siguió por c.c.d.. Una vez completada la reacción, se neutralizó la base con HCl dil. y se añadió cloruro de metileno. Luego de

⁷ Yoshida, Y.; Sakakura, Y.; Aso, N.; Okada, S.; Tanabe, Y.; *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 2183

sucesivas extracciones y de la posterior purificación del producto, por cromatografía en columna de sílica gel, se obtuvo el producto tosilado con un 65 % de rendimiento.

Luego se procedió a sintetizar la 5-*O*-acetil-3-*O*-(1'-imidazolsulfonil)-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa (**28b**, Figura 3.17). En este caso se enfrió a -35 °C, una solución del sustrato **10** (Figura 3.17) en cloruro de metileno y Py. Posteriormente se añadió a la solución enfriada, cloruro de sulfonilo permitiendo el avance de la reacción por 0.5 h. Luego se llevó la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agregó 1H-imidazol. La reacción se siguió por c.c.d. Luego se extrajo y purificó de forma análoga al derivado tosilado, obteniéndose el producto **28b** con un 70 % de rendimiento.

Una vez obtenidos los productos con los grupos salientes respectivos en la posición 3, se procedió a ensayar la reacción de sustitución nucleofílica utilizando azida sódica como nucleófilo (15 equiv), en DMF con ambos sustratos (**28a** y **28b**, Figura 3.17). Las temperatura de reacción en el caso del derivado de xilosa conteniendo el grupo saliente tosilato, (**28a**, Figura 3.17), fue de 120°C. Estas condiciones se seleccionaron en base a publicaciones previas, en las cuales se reportó esta temperatura como la óptima en sustratos similares⁸. La reacción se siguió por c.c.d (se observó la desaparición del sustrato, por revelado de las placas con luz UV y con H₂SO₄ en etanol, en el caso de los diversos productos formados). A las 48 h de reacción se observó aproximadamente un 50 % de conversión, apareciendo dos manchas de menor R_f en la placa de c.c.d, con respecto al R_f del material de partida, que no eran activas al UV. A las 72 h de reacción, se observó prácticamente la desaparición de la mancha del material de partida. En cambio se observó la aparición de tres manchas de menor R_f y una mancha en la línea de base. Se pudieron aislar, por cromatografía en columna, las dos primeras manchas observadas en la c.c.d, obteniéndose en la fracción de mayor R_f la 5-*O*-acetil-3-azido-3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-ribofuranosa (**29**, Figura 3.17) con un 8 % de rendimiento y se determinó que la correspondiente mancha de menor R_f, correspondía a la 3-azido-3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-ribofuranosa (**30**, Figura 3.17). La tercera mancha no se pudo aislar ni identificar, así como la mancha en la línea de base debido al bajo rendimiento de la reacción, se sugiere que estas fracciones corresponden a productos de degradación, debido a las altas temperaturas utilizadas para el avance de la reacción. Asimismo, se realizó un blanco de reacción, en el cual se calentó por 3 días, el compuesto **28a** en DMF, observándose la aparición de una mancha en la línea de base. Los productos fueron asignados por RMN de ¹H y ¹³C. Asimismo, se verificó la asignación del RMN de ¹H por

⁸ Nayak, U.; Whistler, Y.; *J. Org. Chem*, 1969, 34, 3819

experimentos de *homodecoupling* de ^1H . En el caso del producto **29**, se observó un fuerte desplazamiento de la señal correspondiente al H-3 (de 4.86 ppm para el sustrato **28a** a 3.28 ppm para el producto **29**) y la desaparición de las señales correspondientes al grupo tosilo (7.82 y 7.39 ppm). Las demás señales experimentaron pequeñas variaciones en sus desplazamientos. Los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C del producto **30**, fueron marcadamente similares a los obtenidos para el producto **29**, observándose como única diferencia la desaparición en el RMN de ^1H del singlete a desplazamientos alrededor de 2 ppm, correspondiente al metilo del grupo acetilo. Asimismo desaparecieron en el RMN de ^{13}C las señales a 170 ppm y alrededor de 20 ppm, correspondientes al C=O y al metilo del grupo acetilo, respectivamente.

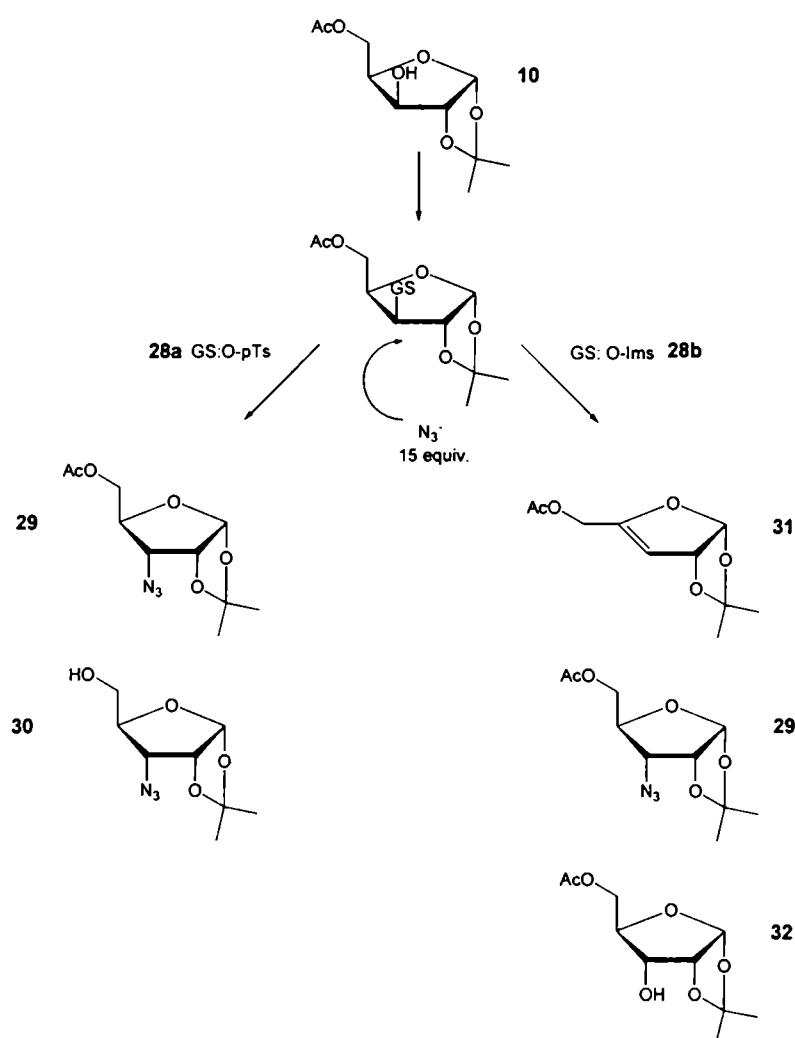


Figura 3.17. Síntesis de la 5-O-acetil-3-azido-3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-ribofuranosa

Las condiciones de reacción óptimas para la reacción de sustitución del derivado de xilosa **28b** (Figura 3.17), conteniendo el mejor grupo saliente, imidazoilsulfonato, fueron similares a las usadas para el caso del sustrato tosilado, pero pudiendo realizar la reacción a una temperatura menor. En este caso la temperatura óptima fue de 70°C. A tiempos intermedios de reacción (24-48h, a porcentajes de conversión menor al 100 %), se observó la aparición de dos manchas de menor Rf que el material de partida, una de las cuales coincidía con el producto **29** (Figura 3.17), obtenido anteriormente. A 72 horas de reacción, se observó la completa desaparición de la mancha correspondiente al material de partida, observándose en este caso, tres manchas de menor Rf, que pudieron ser aisladas por cromatografía en columna de sílica gel y asignadas espectroscópicamente. Estos productos en orden decreciente de Rf fueron: la 5-*O*-acetil-3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-eritro-pent-3-enofuranosa (33 % de rendimiento, **31**, Figura 3.17), la 5-*O*-acetil-3-azido-3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-ribofuranosa (43 % de rendimiento, **29**, Figura 3.17) y finalmente la 5-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-ribofuranosa (9 % de rendimiento, **32**, Figura 3.17). El primer y tercer producto citado, son el producto de la reacción de β -eliminación (**33**, Figura 3.17) del grupo saliente, y el producto de hidrólisis (**32**, Figura 3.17). A mayores tiempos de reacción, se observó la disminución del producto **29**, y el aumento del **31** y **32**, por lo que se tomó 72 h. como tiempo de reacción óptimo. Más allá de la azida obtenida, el producto de eliminación también puede ser un precursor interesante en la obtención de otros nucleósidos modificados.

Como se mencionó anteriormente, una vez obtenido el derivado 5-*O*-acetil-3-azido-3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-ribofuranosa (**29**, Figura 3.18) se procedió a la hidrólisis del grupo acetilo en la posición 5, utilizando K₂CO₃ en metanol, obteniéndose el producto 3-azido-3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-ribofuranosa (**30**, Figura 3.18) con un 90 % de rendimiento, luego de la purificación del mismo por cromatografía en columna de sílica gel. Los espectros de RMN coinciden con los obtenidos anteriormente, para el producto secundario en la reacción de sustitución con azida sódica del derivado tosilado (**30**). En este caso, se observó en el espectro de RMN de ¹H, un desplazamiento de la señal correspondiente a los Hs-5 (los dos dobletes a 4.32 y 4.01 ppm para el sustrato **29** se desplazaron a 3.91 y 3.65 ppm para el producto **30**) y la desaparición de las señales correspondientes al grupo acetilo (el singulete a 2.02 ppm en el espectro de RMN de ¹H y las señales a 170.51 y 20.71 ppm, en el espectro de RMN de ¹³C).

Con el hidroxilo de la posición 5 libre, se procedió a fosforilar esta posición utilizando el reactivo fosforilante, difenilclorofosfato, para lo cual se disolvió el sustrato (**30**, Figura 3.18) en

una solución de TEA en diclorometano, añadiendo luego el reactivo fosforilante. La reacción se siguió por c.c.d., hasta desaparición del material de partida. La mezcla de reacción se extrajo y purificó por cromatografía en columna de sílica gel, obteniéndose el 3-azido-3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-ribofuranosa 5-difenilfosfato con un 68 % de rendimiento (**33**, Figura 3.18).

Resta concluir con las desprotecciones correspondientes de los grupos protectores remanentes en la molécula, para así obtener los dos fosfatos anteriormente citados. Estas reacciones no se llevaron a cabo por falta de tiempo, y asimismo porque no son sustratos objetivos en esta tesis. Se sugieren, a continuación, posibles pasos a seguir, para la obtención de los derivados 3-amino y 3 azido-3-desoxi-D-ribofuranosa 5-fosfato.

En el caso de la obtención del derivado del 3-amino, se sugiere como posible primer paso la desprotección del grupo protector en el grupo fosfato, la cual podría realizarse paralelamente a la reducción del grupo azido al correspondiente grupo amino, por medio de reacciones de hidrogenación catalíticas.

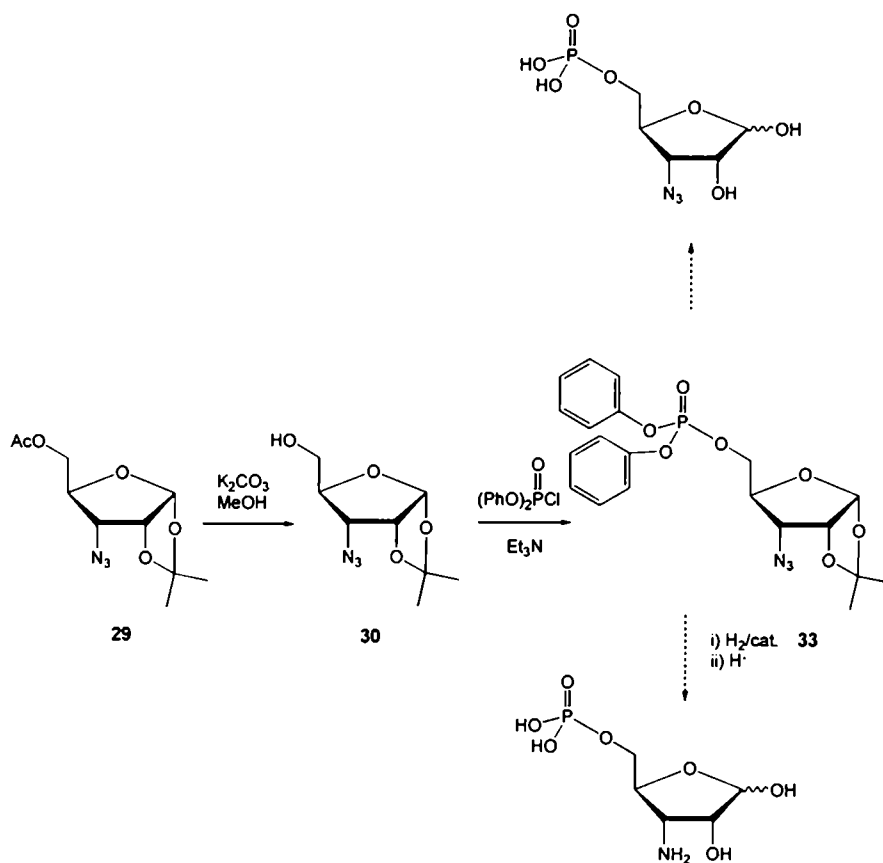


Figura 3.18. Síntesis del difenil (3-azido-3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa) fosfato

Por último se sugiere la hidrólisis ácida del grupo isopropiliden. Esta reacción podría llevarse a cabo con ácidos fuertes, en fase homogénea, así como en fase heterogénea, mediante el uso de resinas de intercambio catiónico.

En el caso de la obtención del derivado 3-azido, se plantea la reacción de desprotección de los grupos fenilos, por métodos no reductivos (ej. NaOH/THF⁹, Bu₄N⁺F⁻/THF/Py./H₂O¹⁰, etc.). Una vez desprotegido el grupo fosfato, restaría hidrolizar en medio ácido fuerte, el grupo isopropiliden, como se citó con anterioridad, para así obtener el 3-azido-3-desoxi-D-ribofuranosa 5-fosfato.

3.3.4- Síntesis de furanosas 5-fosfato

El esquema de la síntesis de las D-furanosas 5-fosfato, sustratos de la PPM, a partir del azúcar libre, se detalla en la **figura 3.1**. Las características que se buscaron en el proceso sintético planteado fueron: la versatilidad del mismo, es decir que fuera un esquema general aplicable a la síntesis de diversas furanosas 5-fosfato, con el objeto que no dependiera de la estructura de la pentosa, la escalabilidad y su viabilidad económica. Se estudió la síntesis de la D-ribosa 5-fosfato como modelo para la síntesis de diversas furanosas 5-fosfato.

3.3.4.1- Síntesis de D-ribosa 5-fosfato

El esquema de la síntesis de la D-ribosa 5-fosfato, se detalla en la **Figura 3.19**. Los dos primeros pasos del esquema sintético de la D-ribosa 5-fosfato se describieron en las primeras secciones de este capítulo. Estos incluyen la protección de carbono anomérico mediante reacciones de glicosidación de Fischer, partiendo de la ribosa desprotegida. Con el objeto de facilitar las asignaciones espectroscópicas de los productos subsiguientes, se decidió concluir la reacción de glicosidación a tiempos cortos, aislando únicamente el anómero metilado con la configuración β del carbono anomérico. Luego se procedió a proteger los demás hidroxilos del azúcar por medio de una reacción de acetilación química, obteniéndose el metil 2,3,5-tri-O-acetil-β-D-ribofuranósido (**1b**, **Figura 3.19**) con un 60 % de rendimiento calculado a partir de la D-ribosa libre. Este producto se sometió a hidrólisis enzimática, utilizando la CRL como biocatalizador obteniéndose de esta forma el azúcar con la posición 5 libre: metil 2,3-di-O-acetil-β-D-ribofuranósido (**10b**, **Figura 3.19**) con un 75 % de rendimiento.

⁹ Nanteuil, G.; Benoist, A.; Rémond, G.; Descombes, J.; Barou, V.; Verbeuren, T.; *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36*, 1435

¹⁰ Ogilvie, K.; Beaucage, S.; *Nucleic Acids Res.*; **1979**, *7*, 805

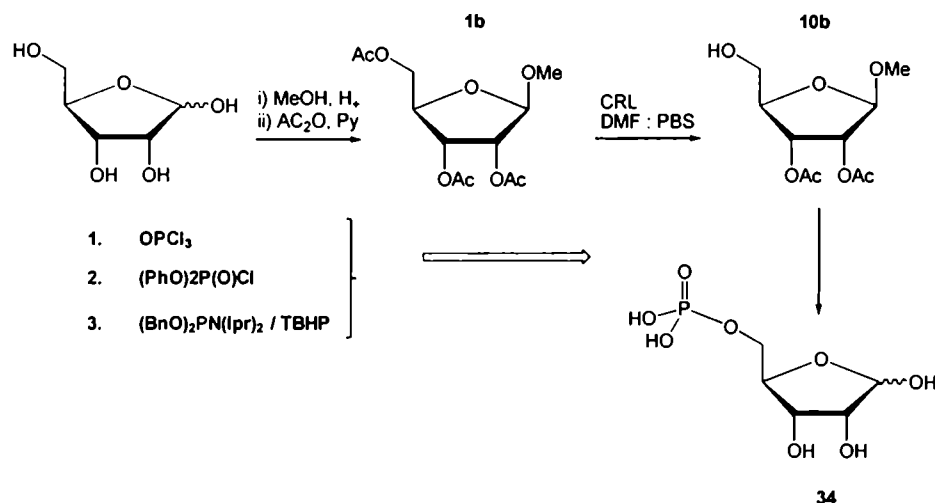


Figura 3.19. Estrategia sintética propuesta para la obtención de D-ribosa 5-fosfato.

Una vez obtenido el derivado D-ribosídico en la forma furanósica con el hidroxilo en la posición 5 libre, se procedió a evaluar la estrategia de fosforilación química más adecuada. En particular, las características de la reacción de fosforilación buscadas fueron: la simplicidad de la reacción tanto para la obtención del derivado fosforilado como su posterior purificación (se precisan para las reacciones posteriores de síntesis enzimática de nucleósidos, la obtención de furanosidos 5-fosfato de elevada pureza, en primer medida con el objeto de obtener valores precisos de cinética y rendimiento, y en segundo lugar debido a que pequeñas trazas de otros fosfatos podrían inhibir dichas reacciones enzimáticas), elevados rendimientos de reacción, y de bajos costos para la obtención de dichos sustratos.

La síntesis química de un fosfato monoéster puede realizarse a partir de un alcohol para así brindar el fosfato directamente. Una de las formas de fosforilación directa más comúnmente utilizadas, es mediante el uso de cloruro de fosforilo (POCl_3). La reacción de un alcohol con dicho reactivo, produce el fosfato tanto en su forma aniónica o como el correspondiente ácido libre, y en general se precisa del empleo de cromatografía de intercambio iónico para su purificación si el fosfato es requerido con elevada pureza. Otra alternativa, puede ser la introducción en primera instancia de un fosfato protegido en su forma de triéster mixto. Esta última aproximación conlleva la ventaja de evitar en algunos casos, reacciones secundarias indeseadas, así como la de proveer un compuesto más sencillo de manipular y purificar. Los triésteres de fosfato son en general neutros y pueden ser purificados por cromatografía en columna de sílica gel.

La estrategia que hace uso de triésteres mixtos es generalmente llevada a cabo utilizando dos tipos de reactivos fosforilantes. El primer tipo contiene especies activadas de P(V), por ejemplo $(RO)_2P(O)Cl$. El segundo tipo de reactivo contiene especies de P(III), que una vez acopladas al alcohol, pueden ser oxidadas para así dar el fosfato deseado. En general los reactivos fosforilantes derivados de P(III) son más reactivos pero tienen la desventaja de ser de elevado costo. Por este motivo se decidieron explorar diversas estrategias de fosforilación, para evaluar cuál era la indicada para la síntesis de cada una de las furanosas 5-fosfato.

En primer lugar, se ensayaron reacciones de fosforilación, utilizando reactivos fosforilantes del tipo P(V): Se estudiaron en este caso, dos posibles rutas sintéticas. La primera consistió en la fosforilación directa del alcohol primario utilizando el reactivo fosforilante $POCl_3$ (**reactivo 1., Figura 3.19**). La segunda fue la formación inicial de un fosfato triéster mixto, utilizando el reactivo fosforilante difenilcloro fosfato $((PhO)_2P(O)Cl)$ (**reactivo 2., Figura 3.19**), que luego fue desprotegido. Por último se estudió la reacción de fosforilación utilizando especies de P (III), la dibencil *N,N*-diisopropil fosforamidita (**reactivo 3., Figura 3.19**).

La primera reacción de fosforilación estudiada fue la del, metil 2,3-di-*O*-acetil- β -D-ribofuranósido (**10b, Figura 3.20**), utilizando $POCl_3$ en Py, siguiendo la metodología descrita para la fosforilación de metil 2,3-isopropiliden-D-ribofuranósido¹¹. Una vez concluida esta reacción, el siguiente paso reportado fue el agregado de agua a la mezcla de reacción, con el objeto de hidrolizar los enlaces P-Cl. La hidrólisis del enlace P-Cl tiene como consecuencia la liberación de HCl, y este medio ácido es el responsable de la hidrólisis del grupo protector acetilo tanto como del grupo metilo del sustrato, obteniéndose finalmente la D-ribosa 5-fosfato totalmente desprotegida.

¹¹ Levene, P.; Stiller, E.; *Journal of Biological Chemistry*, 1934, 104, 299

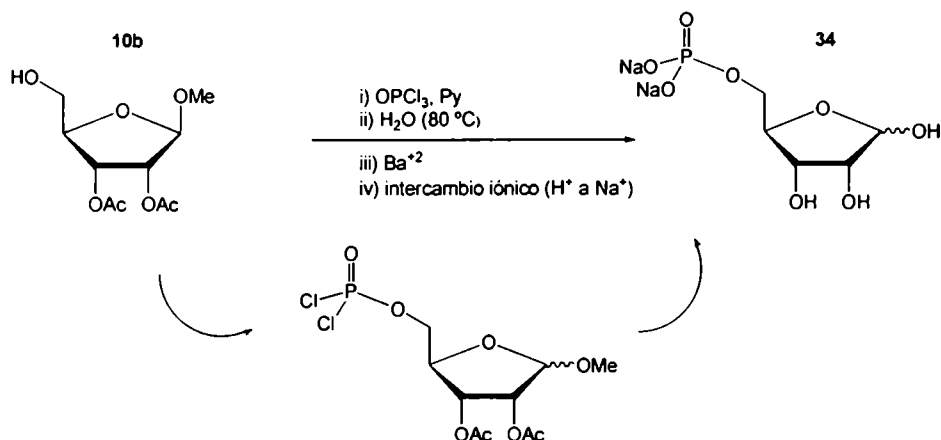


Figura 3.20. Fosforilación química utilizando POCl_3 como reactivo fosforilante

Previo al estudio de la reacción de fosforilación con el metil 2,3-di-*O*-acetil-β-D-ribofuranósido (**10b**, Figura 3.20), se realizó un ensayo de las condiciones de reacción de hidrólisis ácida de los grupos protectores acetilo y metilo del mismo. Para esto, se reprodujeron las condiciones ácidas que se obtendrían por la liberación de HCl a partir de la hidrólisis del enlace P-Cl del oxiclorigeno de fósforo. Esto se logró añadiendo agua a la mezcla de reacción, que consistía en el reactivo fosforilante POCl_3 disuelto en ACN/Py a $0\text{ }^\circ\text{C}$, previo al agregado del sustrato **10b**. De esta forma el oxiclorigeno de fósforo es hidrolizado liberando HCl. Una vez hidrolizado el reactivo fosforilante, se añadió el sustrato acetilado y se aumentó la temperatura a $80\text{ }^\circ\text{C}$. La reacción de hidrólisis se siguió por c.c.d., extrayendo fracciones a diversos tiempos. A medida que avanzó el tiempo de reacción, se produjo una disminución en la intensidad de la mancha correspondiente al sustrato ribofuranósido protegido y se incrementó la intensidad de la correspondiente a la ribosa. A dos horas de reacción se observó la hidrólisis completa de los grupos protectores acetilo y metilo, observándose una única mancha con el mismo R_f que la ribosa.

Habiendo confirmado que el medio ácido generado desprotegía las posiciones 1, 2 y 3, se llevó adelante la reacción de fosforilación directa sobre el sustrato **10b** (Figura 3.20). Para ello se disolvió el oxiclorigeno de fósforo en ACN y se enfrió la solución a $0\text{ }^\circ\text{C}$. Luego se añadió Py a la solución enfriada y finalmente una solución del sustrato acetilado **10b** en ACN. Luego de dos h de reacción, se añadió agua a la mezcla de reacción y se aumentó la temperatura de reacción a $80\text{ }^\circ\text{C}$, continuándose el calentamiento por dos h. Una vez concluida la hidrólisis total de los grupos protectores, se enfrió la solución y el pH se ajustó a cinco con NaOH y se añadió una solución

sobresaturada de BaCl_2 . A $\text{pH} = 5$ precipitaron el fosfato de bario inorgánico producidos por la hidrólisis del reactivo fosforilante remanente y permaneció en solución el fosfato orgánico. Se centrifugó dicha solución, separándose el precipitado del sobrenadante. Se enfrió nuevamente el sobrenadante y el pH se ajustó a 7.5. Finalmente se agregó EtOH a esta solución, promoviendo la precipitación de la sal de bario de la D-ribosa 5-fosfato. Debido a que la sal de bario es parcialmente soluble en solución acuosa neutra, y que se desconoce el efecto del catión bario sobre la actividad de la PPM, del cual dicho fosfato será sustrato, se decidió generar la sal sódica de la D-ribosa-5 fosfato (**34**, **Figura 3.20**) por medio de cromatografía de intercambio catiónico, utilizando la resina Dowex X2-200 equilibrada con medio ácido. Se recolectaron las fracciones ácidas y éstas, fueron neutralizadas con NaOH. Por último, la solución acuosa de la sal sódica de la D-ribosa 5-fosfato (**34**, **Figura 3.20**) fue liofilizada, obteniéndose un cristal de color blanquecino con un 63 % de rendimiento. Este producto fue caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P .

Con el objeto de aumentar el rendimiento del fosfato y también facilitar el proceso de purificación, se ensayó la reacción de fosforilación utilizando difenilclorofosfato como reactivo fosforilante. El metil 2,3-di-*O*-acetil- β -D-ribofuranósido (**10b**, **Figura 3.21**) reaccionó rápidamente con el difenilcloro fosfato y DMAP para dar de esta forma el fosfato triéster, metil 2,3-di-*O*-acetil- β -D-ribofuranosa 5-difenilfosfato (**35**, **Figura 3.21**). Este compuesto fue estable y pudo ser purificado por cromatografía en columna de sílica gel, obteniéndose un rendimiento del 70 %. Se caracterizó por RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P , observando en el espectro de RMN de ^{13}C , dos dobletes correspondientes a las señales del C-5 y C-4 con acoplamientos característicos C-P ($J_{\text{C-5P}} = 5,9 \text{ Hz}$ y $J_{\text{C-4P}} = 8.2 \text{ Hz}$), verificando la formación del fosfato así como su posición. Asimismo se observó una única señal en el espectro de ^{31}P a -12.22 ppm , correspondiente al fósforo en el fosfato triéster.

Una vez obtenido el metil 2,3-di-*O*-acetil- β -D-ribofuranosa 5-difenilfosfato puro (**35**, **Figura 3.21**), se procedió a la desprotección de los grupos fenilos del triéster de fosfato, por hidrogenólisis (55 psi) sobre óxido de platino como catalizador. La reacción se siguió por c.c.d. A 48 h de reacción se observó la desaparición del material de partida activo al UV, sin embargo, se observó la aparición dos manchas de menor R_f , una de las mismas activa al UV. El catalizador fue removido y la mezcla de reacción neutralizada con TEA, y evaporada a presión reducida. Los espectros de RMN del producto de hidrogenólisis tanto de ^{13}C como de ^1H , mostraron que dicho producto consistía en una mezcla de dos compuestos, uno de los cuales fue identificado como el producto de la desprotección total del grupo fosfato, el metil 2,3-di-*O*-acetil- β -D-ribofuranósido 5-

fosfato (**36**, Figura 3.21) y el segundo como el producto de la desprotección parcial del mismo, el metil 2,3-di-O-acetil-β-D-ribofuranosa 5-fenilfosfato (**37**, Figura 3.21), en una relación 1: 0.6.

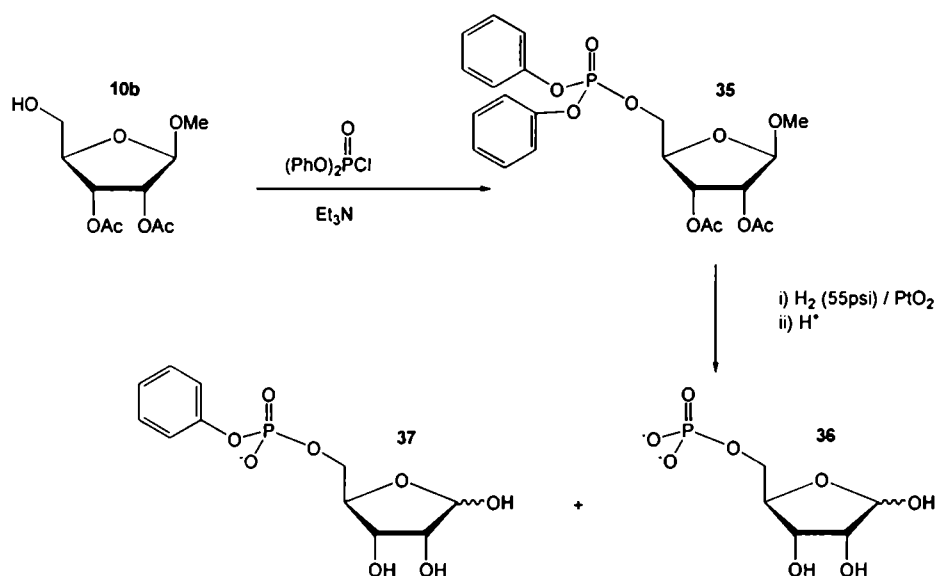


Figura 3.21. Fosforilación química utilizando difenil clorofosfato como reactivo fosforilante

Debido a las condiciones drásticas necesarias para la desprotección del grupo fosfato (elevadas presiones de H_2 y el uso de un catalizador de elevado costo) y los tiempos largos de reacción necesarios para la remoción total de ambos grupos fenilos (tiempos mayores a 48 horas), se decidió modificar el grupo protector del fosfato por un grupo más sencillo de remover. Por lo que se ensayó, la reacción de fosforilación de metil 2,3-di-O-acetil-β-D-ribofuranósido, utilizando como reactivo fosforilante la dibencil *N,N*-diisopropilfosforamidita, mediante la aproximación denominada método de las fosforamiditas. El mecanismo aceptado para dicha fosforilación es la formación de un intermediario tetrazolilfosforamidita, que se produce por la reacción de una fosforamidita con el ácido débil, 1H-tetrazol. Luego se produce un ataque nucleofílico del hidroxilo del azúcar al intermediario citado, produciendo el fosfito triéster. La subsiguiente oxidación del fosfito triéster, produce el correspondiente fosfato de interés.

El tratamiento del **10b** (Figura 3.22) con 1.1 equiv. del reactivo fosfitilante y 1H-tetrazol en THF anhidro enfriados a $-40\text{ }^\circ\text{C}$, produjo el intermediario fosfito, metil 2,3-di-O-acetil-β-D-ribofuranosa 5-dibencilfosfito. La reacción se siguió por c.c.d hasta desaparición del material de partida. Luego se añadió el agente oxidante TBHP, al crudo de reacción y se llevó a temperatura

ambiente. Una vez concluida la oxidación del fósforo, se extrajo y purificó el metil 2,3-di-*O*-acetil- β -D-ribofuranosa 5-dibencilfosfato (**38**, Figura 3.22) por cromatografía en columna de sílica gel, obteniéndose un rendimiento del 64 %. Este producto fue caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P , observando en el espectro de RMN de ^{13}C dos dobletes correspondientes a las señales del C-5 y C-4 con acoplamientos característicos C-P ($J_{\text{C5-P}} = 5,5 \text{ Hz}$ y $J_{\text{C4-P}} = 7.5 \text{ Hz}$), verificando la formación del fosfato así como su posición. Asimismo se observó una única señal en el espectro de ^{31}P a -2.12 ppm , correspondiente al fósforo en el fosfato triéster.

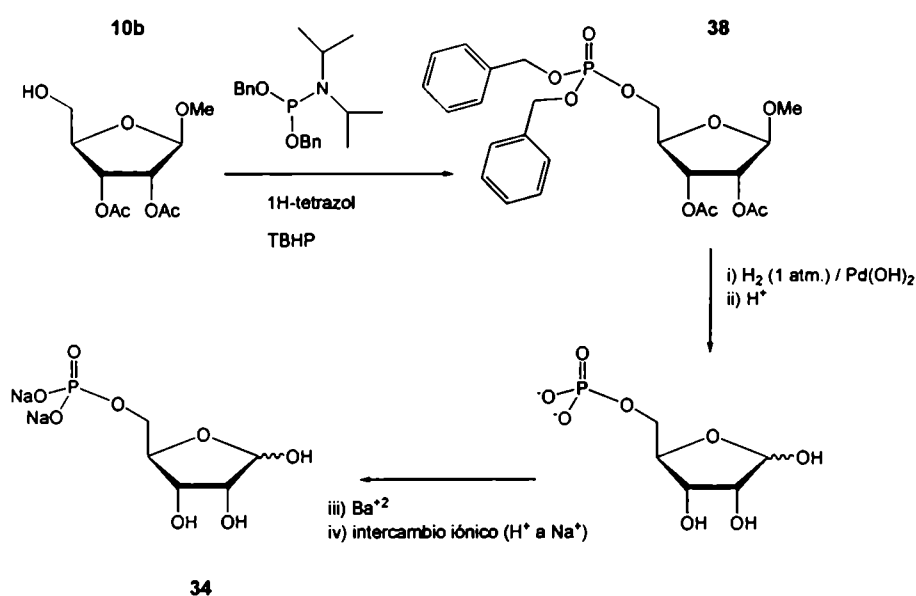


Figura 3.22. Fosforilación química utilizando la dibencil fosforamidita como reactivo fosforilante

Una vez obtenido el metil 2,3-di-*O*-acetil- β -D-ribofuranosa 5-dibencilfosfato puro (**38**, Figura 3.22), se procedió a la desprotección de los grupos bencilos del triéster fosfato, por hidrogenólisis a presión atmosférica sobre hidróxido de paladio/C como catalizador. La reacción se siguió por c.c.d. A 16 h de reacción se observó la desaparición de todas las manchas activas al U.V. La mezcla de reacción se filtró, se le añadió HCl, y colocó en un baño a 80°C por dos horas, con el objeto de hidrolizar los grupos protectores acetilo y metilo del sustrato. La solución conteniendo la D-ribose 5-fosfato fue neutralizada y precipitada como sal de bario, mediante el agregado de una solución saturada de BaCl_2 y etanol. Se generó la sal disódica de forma análoga a la obtenida por el método de fosforilación directa, mediante el uso de una resina catiónica, obteniéndose la sal

sódica de la D-ribosa 5-fosfato (**34**, **Figura 3.22**), con un rendimiento del 50 % calculado a partir del sustrato **10b**.

Comparando los tres métodos estudiados se puede concluir que para la obtención de la D-ribosa 5-fosfato la estrategia más sencilla, económica y que ofrece mejor rendimiento es la fosforilación directa con POCl_3 , obteniéndose el azúcar fosfato con elevada pureza.

3.3.4.2- Síntesis de D-arabinosa 5-fosfato.

Luego, se procedió a la síntesis D-arabinosa 5-fosfato siguiendo la estrategia sintética determinada para la obtención de D-ribosa 5-fosfato, utilizando como reactivo fosforilante el POCl_3 .

Los dos primeros pasos del esquema sintético de la D-arabinosa 5-fosfato, se describieron previamente. Estos incluyen la protección de carbono anomérico mediante reacciones de glicosidación de Fischer, partiendo de la arabinosa desprotegida. Luego se procedió a proteger los demás hidroxilos del azúcar por medio de reacciones de acetilación química, obteniéndose la mezcla anomérica del metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranosido (**2**, **Figura 3.23**) con un 53 % de rendimiento. Este producto se sometió a hidrólisis enzimática, utilizando la CRL, obteniéndose el azúcar con la posición 5 libre (metil 2,3-di-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranósido, **11**, **Figura 3.23**) con un 70 % de rendimiento.

Luego se realizó la reacción de fosforilación directa con POCl_3 sobre el sustrato **11** (**Figura 3.23**), de forma análoga a la realizada para la fosforilación del sustrato **10b**. La reacción se siguió por c.c.d, mostrando un avance similar al obtenido para el análogo ribosídico. Sin embargo, fue imposible separar el fosfato inorgánico del orgánico siguiendo el esquema de precipitación con sales de bario llevado a cabo en el caso de la síntesis de la D-ribosa-5-fosfato. En este caso, a pH = 5, se observó la formación de un precipitado gelatinoso, que debió ser centrifugado. Se realizó una c.c.d a dicha fracción de precipitación, observándose la presencia de cantidades apreciables del fosfato orgánico. Luego del ajuste del pH de la solución a 7.5 y del posterior agregado de etanol, se obtuvieron pequeñas cantidades de la D-arabinosa 5-fosfato, obteniéndose un rendimiento marcadamente inferior al observado para la obtención de D-ribosa 5-fosfato.

Debido a que se requiere el azúcar fosfato de elevada pureza para las posteriores reacciones enzimáticas ya que, como se discutió anteriormente, el fosfato inorgánico es inhibidor de la PPM, se decidió explorar la segunda estrategia de fosforilación exitosa para la obtención del

análogo ribosídico, la cual implicaba el uso de la dibencil *N,N*-diisopropilfosforamida como reactivo fosforilante. Para esto, se trató el metil 2,3-di-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranósido (**11**, Figura 3.23) de forma análoga al sustrato **10b**, obteniéndose, luego de la purificación del producto por cromatografía en columna de sílica gel, el metil 2,3-di-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranosa 5-dibencilfosfato (**39**, Figura 3.23) con un rendimiento del 79%. El producto se caracterizó por RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P , observándose las constantes de acoplamiento típicas ($^2J_{\text{C-P}}$ y $^3J_{\text{C-P}}$) en el espectro de ^{13}C , de las señales correspondientes a los C-5 y C-4, respectivamente. Asimismo se observó en el espectro de ^{31}P , dos señales, correspondientes al fósforo de ambos fosfatos anoméricos.

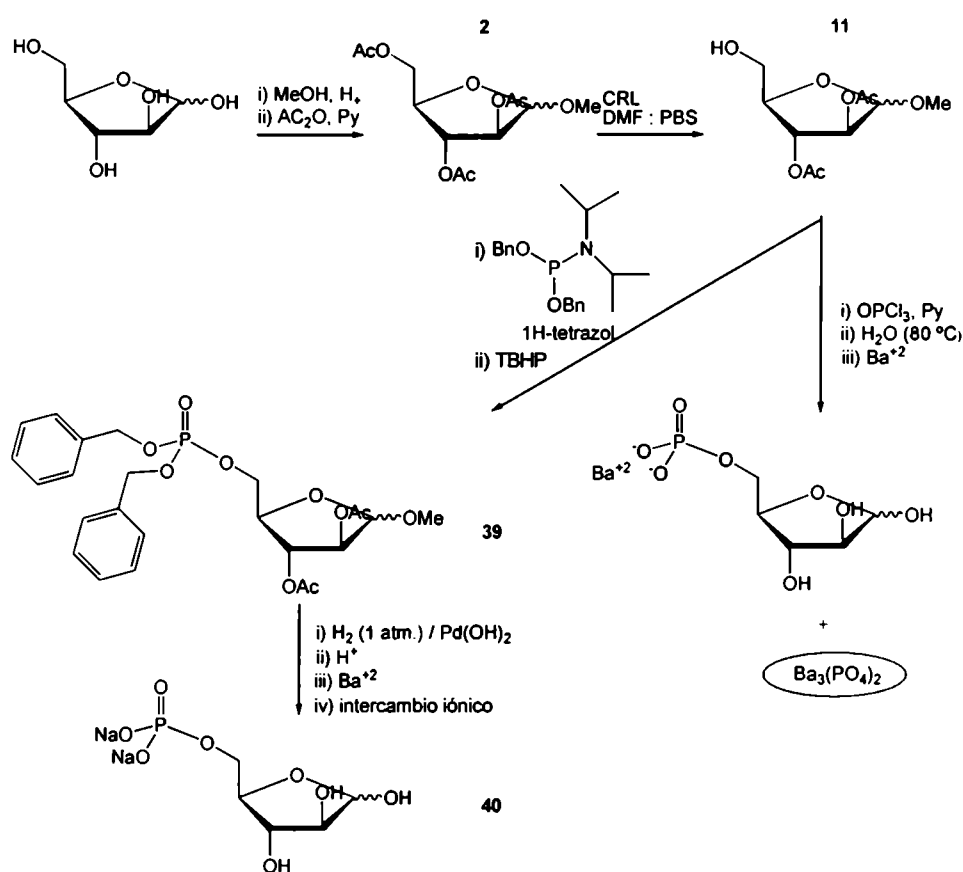


Figura 3.23. Síntesis de D-arabinosa 5-fosfato

Una vez obtenido el metil 2,3-di-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranosa 5- dibencilfosfato puro (**39**, Figura 3.23), se procedió a la desprotección de los grupos bencilos del fosfato triéster por hidrogenólisis, como se citó previamente en el caso del análogo ribosídico. Luego de la

desprotección total del azúcar por medio de hidrólisis ácida, la D-arabinosa 5-fosfato fue precipitada como sal de barrio, aislada por centrifugación y transformada en la sal sódica correspondiente por cromatografía de intercambio iónico, como se describió anteriormente. De esta manera se obtuvo la sal sódica de la D-arabinosa 5-fosfato (**40**, Figura 3.23) de forma pura, con un rendimiento del 68 %. Nuevamente fue caracterizado el producto por RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P . Se observaron en el espectro de RMN de ^{13}C , cuatro dobletes correspondientes a las señales del C-5 y C-4 con acoplamientos característicos C-P (dos dobletes con $^2J_{\text{C5-P}} = 3.6$ Hz y dos dobletes con $^3J_{\text{C4-P}} = 7.2$ Hz, (ambos anómeros). Asimismo se observó una única señal en el espectro de ^{31}P a 3.10 ppm, correspondiente al fósforo del grupo fosfato. Por último, se observó la desaparición de las señales correspondientes a los grupos protectores, tanto del azúcar como del grupo fosfato, en todos los espectros de RMN analizados, confirmando, de esta forma, la identidad del producto obtenido.

3.3.4.3- Síntesis de 2-desoxi-D-ribosa 5-fosfato.

En el caso de la síntesis de la D-desoxirribosa 5-fosfato se debió modificar el esquema sintético previamente descrito para la síntesis de sus análogos D-ribósidos y D-arabinósidos, debido a la imposibilidad de obtener, mediante las reacciones de glicosidación de Fischer, el producto glicosidado únicamente en la forma furanósica. En cambio, se obtuvieron mediante estas reacciones, una mezcla de productos metilados, tanto en la forma furanósica como piranósica, imposibles de separar por cromatografía en columna de sílica gel. Se procedió luego a la acetilación química de esta mezcla de confórmeros glicosidados, con el objeto de estudiar la posible separación de las formas furanósicas peracetiladas de las piranósicas peracetiladas. Nuevamente, no se pudieron aislar eficientemente ambos isómeros peracetilados por métodos de cromatografía en columna de sílica gel, obteniéndose sólo un pequeña fracción del producto metil 3,5-di-O-acetil-D- α -desoxirribofuranosido puro, con un rendimiento del 18 %, calculado a partir del azúcar libre.

Se decidió ensayar condiciones de reacción que favorecieran la ciclación del anillo en la forma furanósica. Con respecto a esto, se describió en el año 1995 por Wengel y colaboradores¹² la síntesis “one pot” asistida por enzimas del derivado triacilado de la 2-desoxi-D-ribofuranosa a partir de la 2-desoxi-D-ribosa. En este estudio, se realizó la acilación regioselectiva catalizada por

¹² Prasad, A.; Sorensen, M.; Paramar, V.; Wengel, J.; *Tetrahedron letters*, 1995, 36, 6163

la CAL-B de la 2-desoxi-D-ribosa, mediante el uso de anhídrido propiónico, obteniendo el derivado 5-*O*-monopropionilado. Con el agregado posterior de anhídrido acético y Py a la mezcla de reacción, se obtuvo la correspondiente pentofuranosa per-*O*-acilada en cantidades cuantitativas a partir del carbohidrato desprotegido.

En base a estos estudios previos, se decidió realizar la acetilación regioselectiva catalizada por la CAL-B de la 2-desoxi-D-ribosa mediante el empleo de anhídrido acético, con el objeto de obtener la 5-*O*-acetil-2-desoxi-D-ribofuranosa, para luego proceder a la peracetilación química del resto de los hidroxilos del azúcar. Una vez obtenida la 1,3,5-tri-*O*-acetil-2-desoxi-D-ribofuranosa, se proyectó el posterior estudio de desacetilación enzimática, con el objeto de obtener el derivado con el hidroxilo de la posición 5 libre.

Se utilizó CAL-B para la acetilación selectiva del hidroxilo primario de la 2-desoxi-D-ribosa con anhídrido acético en THF anhidro. Luego se filtró el biocatalizador, y se añadió a la mezcla de reacción anhídrido acético en py, obteniéndose la 1,3,5-tri-*O*-acetil-2-desoxi-D-ribofuranosa (**41**, **Figura 3.24**) con un rendimiento casi cuantitativo. La completa conversión enzimática de la pentosa desprotegida en su intermediario monoacetilado, así como la conversión al producto final triacetilado, fue monitoreada por c.c.d y sus estructuras confirmadas por sus espectros de RMN. Se obtuvo el producto triacetilado, como su mezcla anomérica, en una relación $\alpha : \beta$ de 1 :1. Los espectros de ^{13}C -RMN del 1,3,5-tri-*O*-acetil-2-desoxi-D-ribofuranosa, muestran dos señales correspondientes a ambos carbonos anoméricos en la mezcla, y todas las señales a desplazamientos típicos correspondientes al esqueleto furanósico. Se observó asimismo, en la región de 170 ppm y 20 ppm, la presencia de 6 señales respectivamente, confirmando la presencia de los tres grupos acetilos en la molécula. Por último se observó en el espectro de ^1H -RMN, dos señales a desplazamientos de 6.40 y 6.38 ppm, correspondientes a los Hs-1.

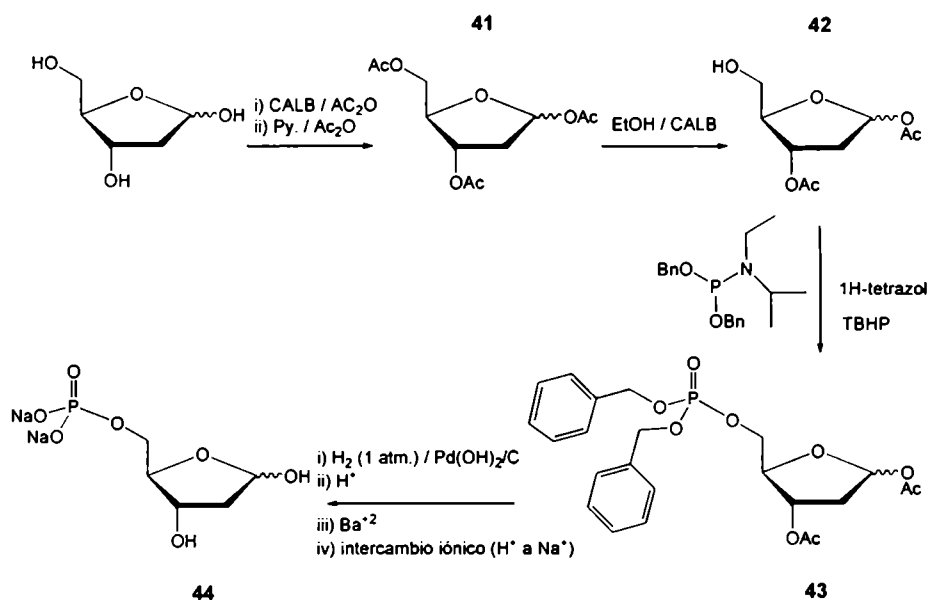


Figura 3.24. Síntesis de la 2-desoxi-D-ribosa 5-fosfato

Una vez obtenido el derivado triacetilado de la 2-desoxi-D-ribosa, se procedió a estudiar la reacción de hidrólisis enzimática. Como ha sido reportado previamente¹³, la acohólisis enzimática catalizada por la enzima CAL-B de metil ribósidos peracetilados, procede regioselectivamente, obteniéndose principalmente los derivados desprotegidos en la posición 5. Por esto, se decidió experimentar la regioselectividad de la reacción de alcoholólisis enzimática, en las condiciones descritas por los autores, sobre el sustrato sintetizado, 1,3,5-tri-*O*-acetil-2-desoxi-D-ribofuranosa (41, Figura 3.24). Se disolvió este sustrato (S) en etanol (E) en una relación E : S = 120 y se añadió el biocatalizador. La reacción de desprotección se siguió por c.c.d. no pudiendo concluirse a conversiones cuantitativas, debido a la aparición de productos de didesacetilación. La mezcla de reacción fue purificada por cromatografía en columna de sílica gel, obteniéndose la 1,3-di-*O*-acetil-2-desoxi-D-ribofuranosa (42, Figura 3.24) con un 91 % de rendimiento y una relación anomérica α : β de 0.9 : 1. El material de partida sin reaccionar se identificó por medio de RMN, determinándose que consistía únicamente en el anómero α sin reaccionar, mostrando estos resultados, que ante la alcoholólisis enzimática el anómero β es hidrolizado con mayor velocidad que el anómero α , aunque ambos isómeros comparten la regioselectividad, siendo enzimáticamente hidrolizados en la posición 5. La regioselectividad de la reacción de alcoholólisis enzimática fue determinada por el análisis del producto de reacción por RMN de ^1H y ^{13}C . El

¹³ Iñigo, S.; Taverna Porro, M.; Monserrat, J.; Iglesias, L.; Iribarren, A., *J. mol. Cat. B*, 2005, 35, 70

análisis por RMN de ^1H de los productos desacetilados de ambos anómeros, mostró un fuerte desplazamiento a campos altos de las señales correspondientes a los Hs-5, (de señales a desplazamientos entre 4.15 y 4.32 ppm correspondientes a los H-5 en el sustrato **41**, a señales entre 3.70 y 3.82 ppm en el producto **42**), mientras que las demás señales no se vieron afectadas en gran medida. Asimismo se verificó el grado de desacetilación, observándose en ambos RMN, la presencia de 4 grupos acetilos.

El paso siguiente fue la reacción de fosforilación del hidroxilo primario. Se decidió utilizar el reactivo fosforilante dibencil *N,N*-diisopropilfosforamidita, debido a los resultados positivos obtenidos previamente para la fosforilación del derivado D-arabinósido. Por lo que se trató la 1,3-di-*O*-acetil-2-desoxi-D-ribofuranosa (**42**, Figura 3.24) de forma análoga al sustrato **10b**, obteniéndose, luego de la purificación del producto por cromatografía en columna de sílica gel, el 1,3-di-*O*-acetil-2-desoxi-D-ribofuranosa 5- dibencilfosfato (**43**, Figura 3.24) con un rendimiento del 76%. El producto se caracterizó por RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P , observándose las constantes de acoplamiento típicas ($^2J_{\text{C-P}}$ y $^3J_{\text{C-P}}$) en el espectro de ^{13}C , de las señales correspondientes a los C-5 y C-4, respectivamente. Asimismo se observó en el espectro de ^{31}P , dos señales a -1.18 y -0.96 ppm, correspondientes al fósforo de ambos fosfatos anoméricos.

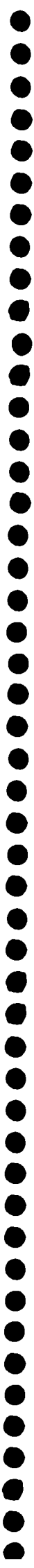
Una vez obtenido el 1,3-di-*O*-acetil-2-desoxi-D-ribofuranosa 5- dibencilfosfato puro (**43**, Figura 3.24), se procedió a la desprotección de los grupos bencilos del fosfato triéster por hidrogenólisis, como se citó previamente en el caso del análogo ribósido. Luego de la desprotección total del azúcar fosfato por medio de hidrólisis ácida, la 2-desoxi-D-ribose 5-fosfato fue precipitada como sal de bario, aislada por centrifugación y transformada en la sal sódica correspondiente por cromatografía de intercambio iónico, como se describió anteriormente. De esta manera se obtuvo la sal sódica de la 2-desoxi-D-ribose 5-fosfato (**44**, Figura 3.24) de forma pura, con un rendimiento del 72 %. Nuevamente fue caracterizado el producto por RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P , observándose dos señales en el espectro de ^{31}P a 2.02 y 3.59 ppm, correspondiente al fósforo de los grupos fosfato de ambos anómeros. Por último, se observó la desaparición de las señales correspondientes a los grupos protectores, tanto del azúcar como del grupo fosfato, en todos los espectros de RMN analizados, confirmando de esta forma la identidad del producto obtenido.

3.3.5- Conclusiones

Se lograron obtener las furanosas 5-fosfato buscadas, materiales de partida en la síntesis enzimática de nucleósidos, desarrollando una estrategia quimio-enzimática versátil para su síntesis, partiendo de los azúcares libres.

Con este fin se discutió en la primer parte de este capítulo, la obtención química de las furanosas protegidas. Luego se estudió la regioselectividad de las reacciones de desprotección mediante reacciones de hidrólisis o alcoholólisis biocatalizadas, utilizando diversas fuentes enzimáticas. Luego se analizaron diversas estrategias sintéticas de fosforilación, seleccionando la más apropiada para cada pentosa estudiada.

Por último se discutió la síntesis de 3-azido-3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranosa 5-fosfato, posible sintón para la obtención de 3-desoxi-3-amino y 3-desoxi-3-azido-D-ribofuranosas 5-fosfato, poniendo de manifiesto la versatilidad sintética de la estrategia quimio-enzimática de obtención de las furanosas 5-fosfato.



Capítulo 4

Sobreexpresión, purificación y ensayos de actividad de la PPM de *Escherichia Coli*

4.1- Objetivos y resumen

El objetivo de este capítulo es la obtención de la PPM de *E. coli* de forma pura, mediante la aplicación de metodologías usuales de biología molecular. La metodología empleada se detalla a continuación:

Construcción de un vector plasmídico, en el cual se insertó el gen completo que codifica para la PPM.

- Transformación de bacterias con dicho vector plasmídico.
- Selección de bacterias transformadas con el plásmido y determinación de las condiciones óptimas para la expresión de la enzima.
- Purificación y concentración de la PPM.

Una vez halladas las mejores condiciones para la expresión enzimática, se optimizaron las condiciones de reacción, evaluando la actividad de la PPM y el rendimiento de una reacción modelo en función de diversos parámetros. Las variables estudiadas fueron: el pH y la temperatura de la reacción, la concentración del agente reductor β -mercaptoetanol, la concentración del metal divalente Mn^{+2} , esencial para la actividad enzimática, la concentración del sustrato ribosa 5-fosfato y del inhibidor fosfato inorgánico y finalmente la concentración del cofactor glucosa-1,6-difosfato.

4.2- Resultados y discusión

4.2.1- Selección del sistema de expresión

Basándonos en lo comentado previamente en la introducción, se optó por el vector de expresión pRSET-A como sistema de expresión de la proteína PPM recombinante en células de *E. coli*. Entre los diferentes motivos que justifican esta elección se pueden mencionar los siguientes:

Microorganismo huésped: el gen que se desea clonar es el de la PPM de *E. coli* K-12. Por lo que se consideró adecuado seleccionar como microorganismo huésped otra cepa de esta misma

bacteria, ya que esto permitiría eliminar algunas barreras de expresión al tratarse de una proteína homóloga. Otras ventajas inherentes a este microorganismo incluyen la sencilla manipulación microbiológica y genética y el amplio conocimiento en relación con los requerimientos y estrategias de cultivo.

Expresión intracelular: la PPM es una enzima monomérica intracelular, lo cual facilita su posterior purificación.

Regulación y niveles de expresión: El plásmido pRSET-A contiene un promotor fuerte para la RNA polimerasa del bacteriófago T7 seguido de secuencias operadoras *lac*, lo que permite regular de manera eficaz la transcripción. La célula huésped posee múltiples copias de este plásmido, el cual expresa de manera constitutiva el represor *lac*, asegurando altos niveles de la proteína represora, la cual se une a las secuencias operadoras en pRSET-A e impide la transcripción de la proteína recombinante cuando el sistema no está inducido. Si se sobreexpresa la proteína de manera constitutiva o en grandes cantidades podría ser tóxica para las células en crecimiento, obteniéndose una menor biomasa. Luego del crecimiento bacteriano, la adición al medio de cultivo del inductor químico isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), induce la expresión de la proteína recombinante al unirse a la proteína represora *lac*, desplazándola del sitio operador, permitiendo que la ARN polimerasa del bacteriófago T7 transcriba las secuencias del gen de interés.

Número de copias: El vector de expresión seleccionado es un vector que expresa la proteína con alto número de copias. De esta forma se puede obtener la proteína en grandes cantidades.

Otras características del vector: El vector pRSET-A posee la secuencia 6xHis-tag, la cual codifica para una cola de seis histidinas en la posición *N*-terminal. Esta secuencia tiene como objetivo facilitar su posterior purificación por cromatografía de afinidad. Asimismo, posee un sitio de hidrólisis de la proteasa enteroquinasa, con el objeto de remover, en caso que fuera necesario, las histidinas añadidas a la proteína de interés. Se conoce que la incorporación de aminoácidos adicionales a la proteína recombinante, puede afectar la funcionalidad de la proteína (interfiriendo en su correcto plegamiento).

4.2.2- Clonado del gen de la PPM de *E. coli* K-12 en el vector pRSET-A

El gen *deoB* que codifica para la PPM de *E. coli* se clonó en el vector pRSET-A a partir del gen obtenido por métodos de amplificación molecular (PCR) A continuación se describen los pasos que se siguieron para obtener el plásmido con el inserto deseado.

Para obtener el gen de interés, primero se buscó la secuencia nucleotídica que codificaba para la PPM de *E. coli* a partir del banco de genes GenBank (número de acceso: U14003). Una vez establecido el marco abierto de lectura a través de la secuencia nucleotídica, se diseñaron los cebadores necesarios para la obtención del gen por medio de PCR. Esto se realizó con el programa "oligo 6.0", obteniéndose los siguientes oligonucleótidos:

Cebador directo (*Forward primer*): 5'ggatccATGAAACGTGCATTTATTATGG 3'

Cebador reverso(*Reverse primer*): 5'ggtaccCTTTTGTGACATAACAAAGGC 3'

Las letras en minúscula indican los sitios de restricción, el primero siendo el sitio de la enzima BamHI y el segundo el correspondiente a la enzima KpnI.

Los cebadores diseñados fueron posteriormente sintetizados y utilizados en la reacción de PCR, utilizando ADN de *E.coli* como templado de la reacción. El producto de amplificación se analizó por medio de electroforesis en geles de agarosa, observándose una banda de aproximadamente 1200 pb, correspondiente al tamaño esperado del gen de la PPM (dato no mostrado). El fragmento de ADN se purificó utilizando un kit comercial (Qiaex II Gel Extraction Kit, QIAGEN GmbH) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El fragmento purificado se clonó inicialmente en el plásmido pGEM-T (Promega), diseñado para productos de PCR, mediante la unión de los residuos de adenina, añadidos por la Taq ADN polimerasa durante la PCR, con los residuos de timidina insertados en el plásmido lineal. La nueva construcción del gen PPM se denominó PGEM-T-PPM. Se determinó la identidad del gen mediante un mapeo con enzimas de restricción, para lo cual se digirió el plásmido con EcoRI obteniéndose un único producto de 1200 pb y la banda correspondiente al plásmido vacío (dato no mostrado). Los clones que poseían el inserto correcto se re-amplificaron en bacterias, se purificó el plásmido y se confirmó la identidad del gen por secuenciación. (ver gráfico en el apéndice)

La traducción de secuencia obtenida corresponde a una proteína de 407 aminoácidos cuya secuencia se observa en la **Figura 4.1**.

10 20 30 40 50 60
 MKRAFIMVLD SFGIGATEDA ERFGDVGADT LGHIAEACAK GEADNGRKGK LNLPNLTRLG
 70 80 90 100 110 120
 LAKAHEGSTG FIPAGMDGNA EVIGAYAWAH EMSSGKDTPS GHWEIAGVPV LFEWGYFSDH
 130 140 150 160 170 180
 ENSFPQELLD KLVERANLPG YLGNCHSSGT VILDQLGEEH MKTGKPIFYT SADSVFQIAC
 190 200 210 220 230 240
 HEETFGLDKL YELCEIAREE LTNGGYNIGR VIARPFIGDK AGNFQRTGNR HDLAVEPPAP
 250 260 270 280 290 300
 TVLQKLVDEK HGQVVSVGKI ADIYANCGIT KVKKATGLDA LFDATIKEMK EAGDNTIVFT
 310 320 330 340 350 360
 NFVDFDSSWG HRRDVAGYAA GLELFDRLRP ELMSLLRDDD ILILTADHGC DPTWTGTDHT
 370 380 390 400
 REHIPVLVYG PKVKPGSLGH RETFADIGQT LAKYFGTSDM EYGKAMF

Figura 4.1. Secuencia de aminoácidos de la PPM de *E. coli*

Posteriormente se escindió por digestión el inserto correspondiente al gen que codifica para la PPM, incubando el plásmido pGEM-T-PPM con la enzima de restricción Eco RI. Se purificó por geles de agarosa y se subclonó el gen de interés en el vector de expresión pRSET-A (Stratagen). El plásmido se denominó pRSET-A-PPM (Figura 4.2).

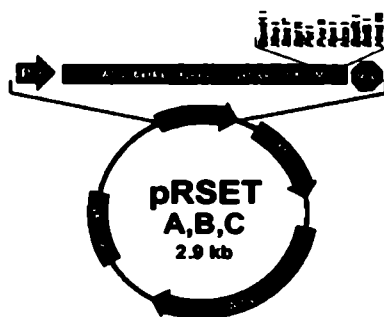
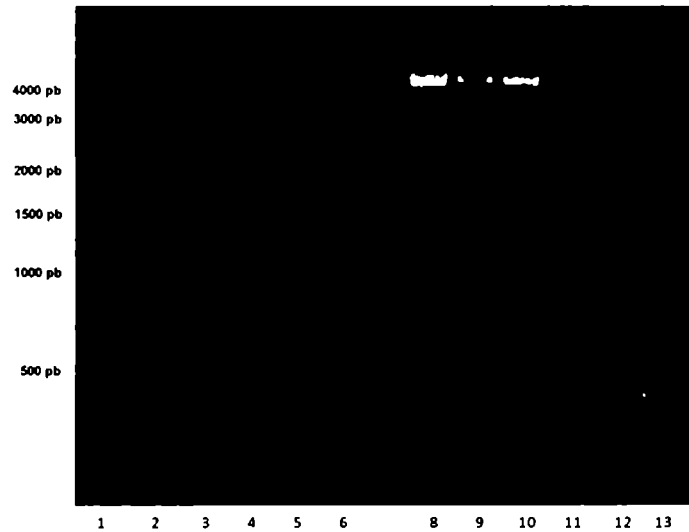


Figura 4.2. Esquema del plásmido pRSET-A

4.2.3- Transformación del plásmido pRSET-A-PPM en bacterias competentes *E. coli* BL21(DE3)pLysS

La transformación involucra la introducción del plásmido recombinante pRSET-A-PPM en células bacterianas competentes. Para ello se transformó el plásmido correspondiente, en primer lugar, en una cepa de *E. coli*, la cepa DH5- α , útil para su transformación con plásmidos recombinantes utilizando la metodología de "shock térmico". Las bacterias transformadas se sembraron en placas de Petri con medio LB sólido con ampicilina, X-gal e IPTG. Finalmente, se incubó la placa durante toda la noche a 37°C. A continuación se analizaron las colonias por aparición del color azulado debido a la reacción colorimétrica con X-gal, confirmando de esta forma la inserción del gen en el vector de expresión. Luego, se aislaron los plásmidos por el método de lisis alcalina (miniprep) y se chequeó la presencia del inserto utilizando enzimas de restricción y analizando los fragmentos por electroforesis en geles de agarosa (**Figura 4.3**). En el caso de la digestión con la enzima de restricción HindIII, ésta hidroliza el plásmido en dos posiciones, una de las cuales se encuentra en el gen clonado y la otra en el plásmido, observándose dos bandas (>1000 pb la primera y aprox. 3000 pb la segunda). En cambio, en la digestión del plásmido con la enzima de restricción PstI, se observa una única banda de aprox. 4200 pb, debido a que existe solo un sitio de corte en el plásmido. Esta banda equivale a la suma del gen (± 1200 pb) y del vector de expresión (± 3000 pb), confirmándose nuevamente la identidad del gen en el vector de expresión.

Finalmente, se transformó con el plásmido pRSET-A-PPM, la cepa de *E. coli* BL21, siguiendo la metodología descripta anteriormente. Para confirmar la correcta expresión de la PPM: en primer lugar, se plaquearon las células transfectadas en medio LB sólido con ampicilina/cloranfenicol, para luego escoger una colonia, la cual se hizo crecer en medio LB líquido con ampicilina/cloranfenicol y finalmente se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG. Asimismo se realizó un control sin inducción para utilizar como referencia. Las células se sonicaron y se analizaron los sobrenadantes del lisado por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), observándose el aumento en la intensidad de la banda de peso molecular 42 kDa en las columnas sembradas con el lisado de las células inducidas con respecto a las correspondientes sin inducir.



Columna 1: Marcador de peso molecular.
Columna 2-6: Plásmido digerido con la enzima de restricción HindIII.
Columna 8-12: Plásmido digerido con la enzima de restricción PstI.
Columna 13: Marcador de peso molecular.

Figura 4.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del vector pRSET-A-PPM.

4.2.4- Expresión y purificación de la proteína recombinante PPM de *E. coli*

Para la sobreexpresión en mayor escala de la PPM-(HIS)₆, las bacterias transformadas fueron crecidas en medio LB líquido durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se realizó una dilución del cultivo 1:20 y una vez alcanzada la densidad óptica óptima (aprox. 0.5 OD), se indujo la expresión proteica añadiendo al medio de cultivo IPTG. Una vez concluido el tiempo de inducción se centrifugó y resuspendió en buffer, el pellet bacteriano. Luego se lisaron las bacterias por sonicación, se centrifugó y evaluó, por medio de SDS-PAGE, los niveles de expresión de la proteína recombinante y la localización subcelular. De esta manera se pudo confirmar que la enzima se encontraba mayoritariamente en el sobrenadante, lo cual es una evidencia que su estructura no se encuentra alterada y probablemente sea funcional.

A continuación se optimizaron la concentración del inductor y el tiempo de inducción para obtener la mayor cantidad posible de proteína recombinante. En primer lugar, se realizó el ensayo de inducción empleando concentraciones de IPTG de 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM durante 3 horas a 37°C. Luego se realizó un ensayo extrayendo alícuotas del cultivo a diversos tiempos, a una

concentración de IPTG constante (1 mM). Se compararon en cada caso, los perfiles de expresión por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida. Las condiciones de inducción óptimas establecidas fueron la adición de IPTG 1 mM y 4 horas de incubación a 37 °C.

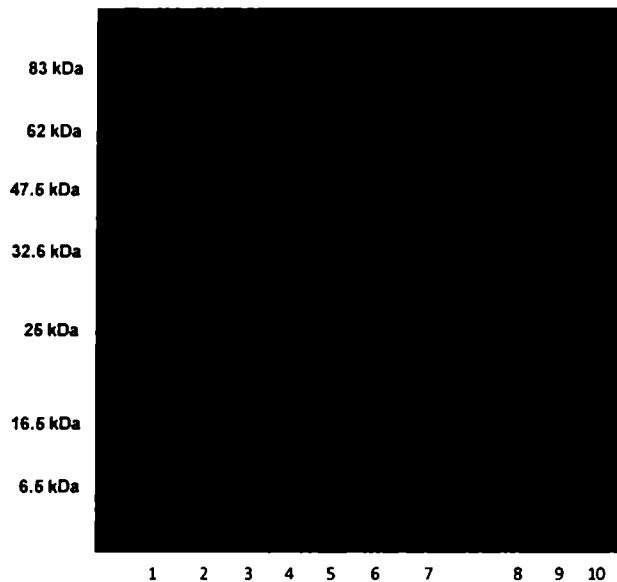
Para llevar a cabo la purificación de la PPM recombinante a partir de lisados crudos de *E. coli* BL21 transformada, se utilizó un polímero de agar funcionalizado con NTA (ácido nitriloacético) para la unión del ion Ni^{+2} . Esta tecnología permite purificar en un solo paso proteínas que contengan una cola de histidinas. NTA es un quelante de iones metálicos como en el caso del Ni^{+2} , ocupando 3 sitios de unión de la esfera de coordinación del ión, dejando tres sitios libres para interactuar con los residuos de histidina, a través de los anillos imidazólicos que forman parte de la estructura del aminoácido. Estos anillos se unen a los iones Ni^{+2} inmovilizados por los grupos NTA de la matriz. El imidazol mismo también puede unirse a los iones níquel y, por un mecanismo competitivo, puede llegar a desplazar los residuos de histidina de las proteínas. A bajas concentraciones de imidazol se previenen las uniones inespecíficas y de baja afinidad de otras proteínas (lavados), mientras que las que poseen la estructura 6xHistag se unen fuertemente. Por lo que se puede eluir específicamente la proteína de interés modificando la concentración de imidazol en el eluyente.

Se siguieron las indicaciones del fabricante (QIAGEN) para purificar la PPM utilizando la resina de Ni^{+2} , aumentando la concentración de imidazol, en buffer fosfato y solución salina de NaCl. La solución amortiguadora mantiene el pH en un valor óptimo para la unión de la cola de histidina a la resina (pH = 8) y la solución salina es utilizada para prevenir la unión inespecífica de proteínas cargadas negativamente. Paralelamente se ensayaron otras condiciones de elución. Las nuevas condiciones se buscaron en base a diversos motivos: i) El fosfato inorgánico es inhibidor de la PPM, por lo que se decidió buscar como solvente de elución, otros tipos de soluciones amortiguadoras, distintas al fosfato; ii) la estructura química del imidazol es similar a la de las bases que forman parte de los nucleósidos. Siendo las últimas, sustratos de las nucleósido fosforilasas (NPs) que se utilizaran para la síntesis de nucleósidos presentada en esta tesis, se decidió eliminar el imidazol del solvente de elución debido a que se desconoce el efecto del mismo en la actividad de las mismas. Las nuevas condiciones de elución de la columna Ni-NTA, se seleccionaron explotando las propiedades químicas del aminoácido histidina. Éste es un aminoácido básico, por lo que a pH neutro se encontrará desprovisto de carga, mientras que a pH ácido, se formara el ácido conjugado del anillo imidazólico, de carga positiva. Por lo que a pH ácido la proteína con la cola de histidinas, no será retenida por la columna y podrá ser eluída. El buffer

de lavado utilizado en este protocolo alternativo fue Mops a pH = 7 en solución salina, y el buffer utilizado para la elución de la proteína fue el buffer acético/acetato a pH = 4,5.

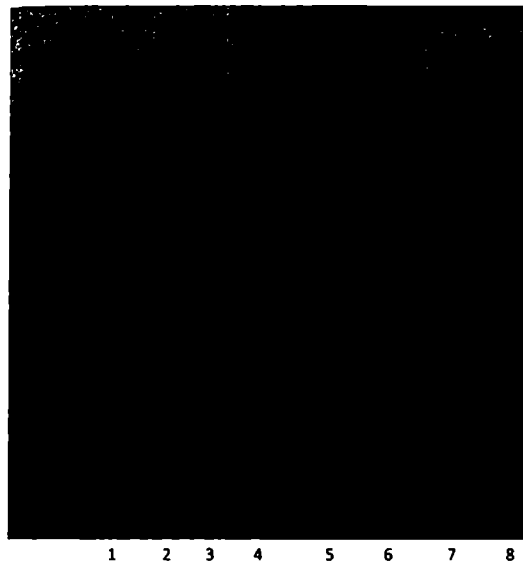
Para la purificación por cromatografía de afinidad, se procedió a pasar el lisado crudo centrifugado a través de la columna Ni-NTA. El análisis por SDS-PAGE de las fracciones colectadas variando la concentración de imidazol (**Figura 4.4A-**), reveló la presencia de la proteína de interés (una única banda de aprox. 42 kDa, peso molecular concordante con el peso molecular de la PPM) con un alto grado de pureza, no observándose dicha banda en las fracciones correspondientes a los pasos de lavado de la columna. En cambio, los resultados de la purificación de la PPM por cromatografía de afinidad, variando el pH de la solución amortiguadora, no fueron tan eficientes comparados a los obtenidos mediante la primer metodología empleada. En este caso, el análisis por SDS-PAGE reveló la presencia de la proteína de interés tanto en las fracciones colectadas correspondientes a los pasos de lavado como en las correspondientes a los pasos de elución (**Figura 4.4B-**), mostrando en todos los casos la presencia de otras proteínas, obteniéndose a la proteína con bajo rendimiento y bajo grado de pureza. Esto puede deberse a la unión inespecífica de otras proteínas a la resina, que en el caso de la elución con imidazol se evita añadiendo el mismo en bajas concentraciones.

A



Columna 1: Lisado de *E. coli* transfectada con el plásmido pRSET-A-PPM.
Columna 2: Fracción correspondiente al primer paso de lavado de la columna.
Columna 3: Marcador de peso molecular.
Columna 4-6: Fracciones correspondientes a los subsiguientes pasos de lavado de la columna.
Columna 7-10: Fracciones correspondientes a los pasos de elución de la columna.

B



Columna 1 y 5: Lisado de *E. coli* transfectada con el plásmido pRSET-A-PPM.
Columna 2: Fracción correspondiente al primer paso de lavado de la columna.
Columna 3-4: Fracciones correspondientes a los subsiguientes pasos de lavado de la columna.
Columna 5-8: Fracciones correspondientes a los pasos de elución de la columna.

Figura 4.4. Purificación de la proteína PPM recombinante de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad en resina de NTA-Ni²⁺. A. elución por imidazol. B. elución por pH.

Con estos resultados, se decidió que la estrategia más adecuada para la purificación de la proteína recombinante utilizando cromatografía de afinidad, era la elución de la misma variando las concentraciones de imidazol en el solvente de elución, ya que se obtiene la proteína PPM con elevado grado de pureza y altos rendimientos. La desventaja de esta estrategia es que precisa un paso posterior de eliminación del imidazol y de la solución amortiguadora, presentes en las fracciones de elución junto con la proteína PPM recombinante.

Para la posterior eliminación del imidazol y de la solución amortiguadora de la fracción pura se estudiaron dos alternativas: i) desalado por cromatografía de permeación de geles, y ii) diálisis y concentración de la proteína. La primera alternativa estudiada se ensayó utilizando dos resinas de exclusión Bio-Gel P-6DG (BIO-RAD) y Sephadex G-25 (GE Healthcare). Ambas resinas son apropiadas para el desalado de proteínas con un rango de fraccionamiento de 1000-6000. Las fracciones eluidas se evaluaron al UV, no pudiéndose encontrar las condiciones óptimas para la resolución de la fracción proteica de la imidazólica, co-eluyendo ambas fracciones. Este resultado puede ser debido a la alta concentración de imidazol en la solución inicial, saturando de esta forma la columna.

La segunda alternativa estudiada fue la diálisis, para lo cual se utilizó una membrana con un valor de corte (*cut off*) de 10 kDa. Este proceso permitió la remoción de las sustancias inhibitoras de peso molecular pequeño (< 10 kDa), mientras que la proteína fue retenida dentro de la membrana. La diálisis se realizó contra la solución de almacenamiento (buffer Tris pH = 8, Mn²⁺ 1 mM, EDTA 0.1 mM) y posteriormente para concentrar la solución proteica, se colocó la membrana conteniendo la solución enzimática sobre escamas de polietilenglicol (PEG) de peso molecular > 10 kDa, dejándola hasta obtener la concentración de la solución proteica deseada. La concentración de la proteína en la solución se midió utilizando la metodología descrita por Bradford. Se observó que a concentraciones superiores a 0.5 mg/ml, la proteína PPM precipitaba, por lo que la concentración final de la proteína fue establecida en 0.3 mg/ml.

Para comprobar la actividad de la enzima recombinante obtenida, se acopló a la reacción de migración del grupo fosfato, la reacción de glicosidación enzimática usando la PNP, utilizando como modelo la conversión de ribosa 5-fosfato a adenosina, como lo indica la **Figura 4.5**.

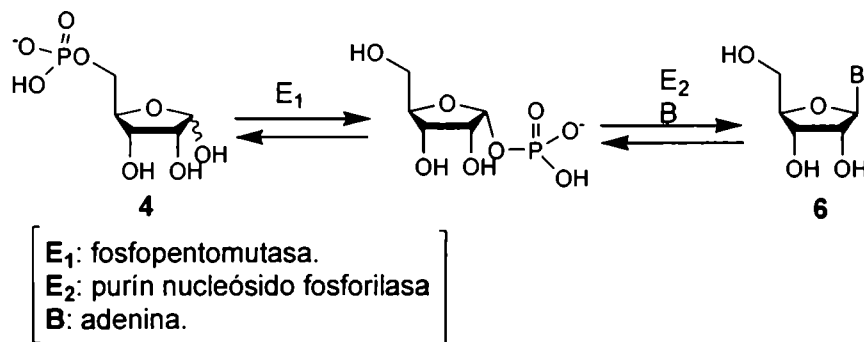


Figura 4.5. Síntesis de nucleósidos por glicosidación partiendo de furanosas 5-fosfato.

La actividad enzimática observada fue por debajo de lo esperado, obteniéndose rendimientos del 25 % a tiempos prolongados de reacción (5 días). Estos bajos rendimientos y actividades de la PPM recombinante se podrían deber a diversos factores, tales como:

- Efectos concernientes al pasaje de la proteína por la resina de cromatografía de afinidad.
- Presencia de aminoácidos adicionales en la proteína (cola de histidina, etc), que podrían interferir en el correcto plegamiento de la proteína
- Incorrecto plegamiento de la enzima luego de su expresión en grandes cantidades.

Se ensayó, en primer lugar, la reacción de hidrólisis de los aminoácidos adicionales de histidina, utilizando la proteasa enteroquinasa, para de esta forma removerlos del esqueleto proteico. Se exploraron diversas condiciones con el objeto de hidrolizar los mismos, sin éxito. Esto podría deberse a que la cola de histidina en la conformación nativa de la PPM estuviera localizada dentro del dominio proteico siendo, por lo tanto, inaccesible para la hidrólisis enzimática.

Paso	U ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg prot.}$)	grado de purificación	Rend. % (h)
Diálisis simple*	1.5	1	25 (120)
Diálisis doble**	18.1	12	40 (70)
Diálisis triple***	47.8	32	80 (50)

*Diálisis simple: eluido cromatográfico contra buffer de almacenamiento.

** Diálisis doble: eluido cromatográfico contra solución de EDTA 10 mM, y buffer de almacenamiento.

*** Diálisis triple: eluido cromatográfico contra solución EDTA 10 mM, desnaturalización con urea 6M y diálisis progresiva contra agua, y finalmente contra buffer de almacenamiento.

Tabla 4.1. Resultados de la purificación de la PPM.

En segundo lugar, se evaluó el efecto del pasaje de la proteína por la resina de afinidad en la actividad enzimática. Debido a que la resina funciona como un agente quelante de metales, es factible que la disminución de la actividad enzimática observada pudiera estar asociada a pérdidas parciales del ión Mn^{+2} del centro activo de la enzima debido al reemplazo del mismo por el ión Ni^{+2} unido a la resina. La presencia de un ión divalente en el sitio activo de la PPM es esencial para mantener su actividad catalítica. Se ha reportado que la actividad de la PPM es dependiente de la identidad del metal divalente unido a la misma¹, siendo la actividad de la metaloproteína asociada a Ni^{+2} , 12 % de la actividad de la PPM asociada a Mn^{+2} . Para evaluar este efecto, se dializó una solución enzimática contra buffer Tris pH=8 y 10 mM de EDTA durante toda una noche, para luego realizar una nueva diálisis contra el buffer de almacenamiento. La actividad de la nueva solución enzimática doblemente dializada se incrementó con respecto a la inicial (12 %), demostrando de esta forma el intercambio del ion níquel del centro activo por el Mn^{+2} . Mediante la diálisis doble de los eluidos de la columna de afinidad se logró obtener un rendimiento del 40% en un periodo menor de tiempo (70 h, **tabla 4.1**).

Aunque los resultados obtenidos mediante el intercambio de metales mostraron un aumento en la actividad enzimática, el valor de la misma continuó siendo bajo. Esto puede deberse al incorrecto plegamiento de una fracción de la proteína expresada y a la formación de agregados proteicos, insolubles en solución acuosa. Por esta razón se realizó, luego de los pasos descritos anteriormente, la desnaturalización y solubilización de la proteína utilizando urea 6 M. Posteriormente se llevó a cabo la renaturalización de la PPM, removiendo la urea lentamente por diálisis, realizando finalmente una diálisis contra buffer de almacenamiento. Como se muestra en la **Tabla 4.1**, la actividad enzimática se incrementó drásticamente en el proceso de desnaturalización-renaturalización, confirmando de esta forma la hipótesis asociada a un incorrecto plegamiento enzimático durante la sobreexpresión.

4.2.5- Optimización de la actividad de la PPM

Una vez optimizado el paso de purificación de la proteína recombinante, se continuó con la evaluación de las condiciones de reacción que permitieran obtener los mejores resultados de actividad enzimática y rendimiento para la reacción modelo estudiada, esto es, la conversión a adenosina a partir de ribosa 5-fosfato y adenina, mediante el sistema enzimático acoplado (PPM y

¹ Hammer-Jespersen, K.; Munch-Petersen, A.; *Eur. J. Biochem.*, **1970**, *17*, 397

PNP) como biocatalizador. Con el objeto de determinar dichas condiciones, se estudió la dependencia de la actividad enzimática y el rendimiento en función de los siguientes parámetros:

- pH.
- Temperatura.
- Concentración del co-factor glucosa-1,6- difosfato.
- Concentración del agente reductor β -mercaptoetanol.
- Concentración del inhibidor fosfato inorgánico.
- Concentración del Mn^{+2} .

i) Efecto del pH sobre el rendimiento y la actividad

La actividad enzimática y el rendimiento de la reacción mostraron un pH óptimo alrededor de 7 (Figura 4.6), para visualizar la actividad y el rendimiento con mayor claridad, estas propiedades se indican como cantidades relativas para cada experimento, asignando al valor máximo de cada experimento, el valor relativo del 100%. El cambio en las condiciones de pH en una unidad, drásticamente redujo la actividad y el rendimiento, siendo este efecto más importante cuando se incrementó el valor de pH. Ha sido reportado previamente¹ que el valor de pH óptimo para la PPM aislada de *E. coli* era de 8, mientras que para la PNP (presumiblemente de *Cellulomonas*, el origen bacteriano de la enzima PNP comercializada por Sigma se discute en la próxima sección) el pH óptimo reportado se encontró en el rango de pHs 7-8². La diferencia en el pH óptimo reportado en este trabajo con respecto al reportado previamente podría ser originada por diferencias en la secuencia aminoacídica de la enzima sobreexpresada, como ser el fragmento de polihistidinas diseñado para la purificación de la misma por cromatografía de afinidad.

² Wielgus-Kutrowska, B.; Bzowska, A.; Tebbe, J., Koellner, G.; Shugar, D.; *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1597, 320

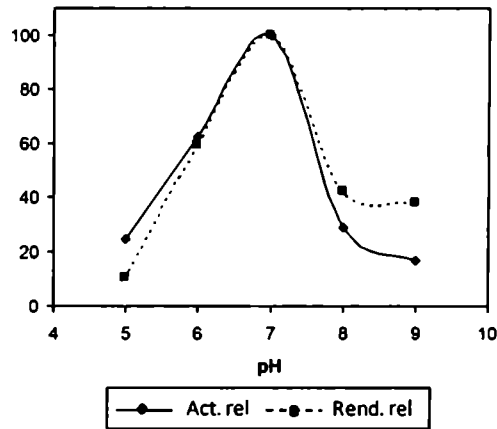


Figura 4.6. Actividad de la PPM y rendimiento de la reacción de síntesis de adenosina relativos en función del pH.

ii) Efecto de la concentración de β -mercaptoetanol sobre el rendimiento y la actividad

El análisis de la actividad y el rendimiento de la reacción variando las concentraciones de β -mercaptoetanol, mostró que la actividad enzimática de la PPM posee un requerimiento absoluto para esta sustancia, siendo totalmente inactiva en ausencia de la misma. Como se observa en la Figura 4.7, la concentración de 200 mM maximiza la actividad de la enzima, así como el rendimiento de la reacción modelo.

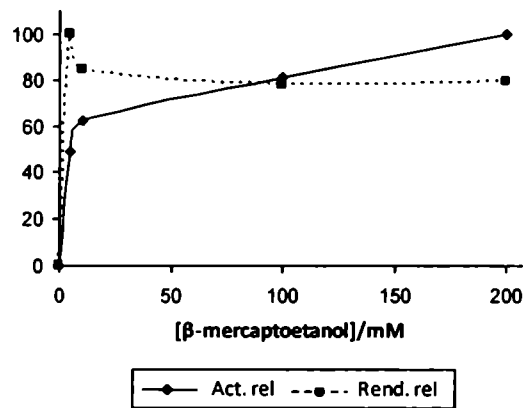


Figura 4.7. Actividad de la PPM y rendimiento de la reacción de síntesis de adenosina relativos en función de la concentración de β -mercaptoetanol.

iii) Efecto de la concentración de la ribosa 5-fosfato.

Asimismo se analizó la influencia de la concentración del sustrato, ribosa 5-fosfato. Mientras que la actividad siguió un comportamiento típico de Michaelis-Menten en el rango de concentraciones de sustrato estudiado (0-4 mM), el rendimiento alcanzó un máximo a la concentración de sustrato de 1 mM y lentamente cayó al 80 % del rendimiento máximo, a concentraciones de sustrato de 4 mM (Figura 4.8). Se calcularon los datos cinéticos mediante la gráfica de Lineweaver-Burke, obteniéndose un valor de $K_m = 3.4$ mM y $V_{max} = 4.8$ $\mu\text{M}/\text{min}$, ambos para las condiciones no optimizadas de reacción.

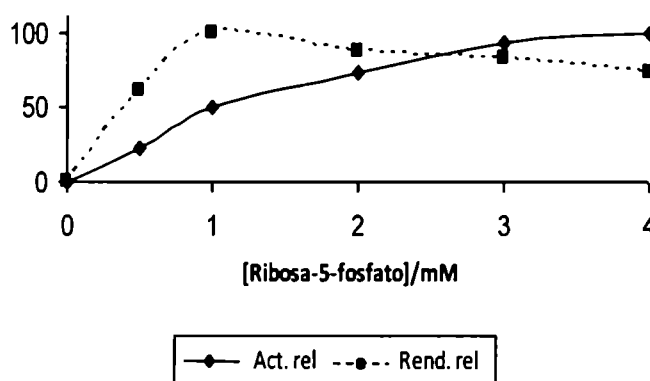


Figura 4.8. Actividad de la PPM y rendimiento de la reacción de síntesis de adenosina relativos en función de la concentración de ribosa 5-fosfato.

Por este motivo, se seleccionó 1 mM como concentración de sustrato en las condiciones de trabajo. El efecto de la disminución en los rendimientos de la reacción con el aumento en la concentración de sustrato se encuentra relacionado a la presencia del ión fosfato liberado como subproducto de la reacción de glicosidación enzimática llevada a cabo por la PNP. Este efecto se evaluará en la posterior sección.

iv) Efecto del fosfato inorgánico sobre el rendimiento y la actividad.

Con el objeto de examinar el efecto inhibitorio del fosfato inorgánico formado como subproducto de la reacción de síntesis de adenosina, se estudió el impacto de la variación de la concentración de fosfato inorgánico en la actividad enzimática y en el rendimiento de la reacción (Figura 4.9). Se utilizó fosfato de sodio puro para el ensayo de inhibición y se observó que ambos

parámetros fueron marcadamente afectados por esta variable. Se intentó precipitar selectivamente el fosfato inorgánico en presencia de la ribosa 5-fosfato en el medio de reacción mediante diversas metodologías, sin embargo, todos los esfuerzos resultaron infructuosos en nuestras manos. Como se observa en la **Figura 4.9**, a concentraciones de fosfato inorgánico de 1 mM, la actividad enzimática decae a un 15 % de la correspondiente actividad medida en ausencia de inhibidor. Con estos resultados se puede explicar el origen de la disminución del rendimiento de la reacción con el aumento en la concentración de sustrato.

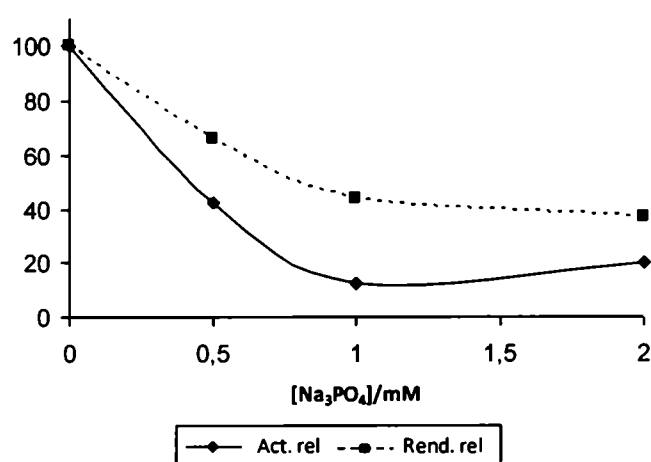


Figura 4.9. Actividad de la PPM y rendimiento de la reacción de síntesis de adenosina relativos en función de la concentración de fosfato inorgánico.

v) Efecto de la temperatura sobre el rendimiento y la actividad.

Posteriormente, se estudió la dependencia de la actividad enzimática y el rendimiento con la temperatura, determinando que la temperatura de 45°C es una condición apropiada para conducir estos experimentos en el rango de temperaturas estudiado (**Figura 4.10**). Las temperaturas óptimas descritas en bibliografía, para las enzimas en el sistema acoplado, son: para la PPM de *E. coli* 45°C³ y para la PNP 70°C (la actividad estudiada fue la de la fosforólisis de la inosina, observándose que en el rango de temperaturas entre 20 – 70 °C, la actividad de dicha reacción aumentaba exponencialmente con la temperatura, mientras que a temperaturas mayores a 70 °C, la proteína se desnaturalizaba, disminuyendo así su actividad²). Considerando

³ Hamamoto, T.; Noguchi, T.; Midorikawa, Y.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998, 6, 1103

que se estudia la temperatura óptima de un sistema acoplado de enzimas, es lógico que dicha temperatura, para la reacción estudiada en esta tesis, sea la de la PPM. No se pudo explicar el descenso de la actividad a 37 °C con respecto a la temperatura de 30 °C.

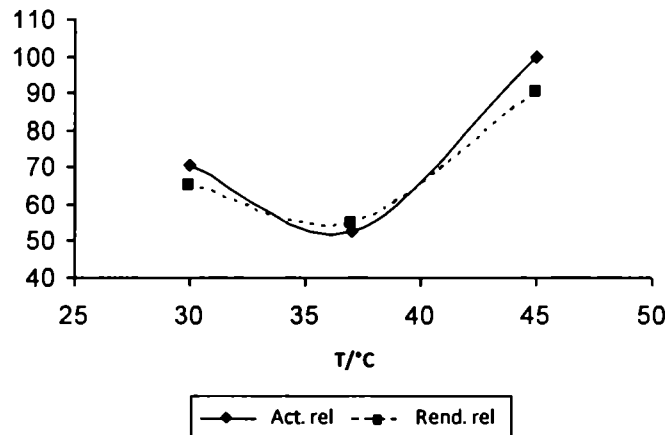


Figura 4.10. Actividad de la PPM y rendimiento de la reacción de síntesis de adenosina relativos en función de la temperatura.

vi) Efecto de la concentración glucosa-1,6-difosfato sobre el rendimiento y la actividad.

El análisis de la actividad y el rendimiento de la reacción variando las concentraciones del co-factor, glucosa-1,6-difosfato, mostró un pequeño aumento en la actividad enzimática de la PPM, obteniéndose idénticos rendimientos a diversas concentraciones del mismo. Esto puede deberse a que la pequeña variación de la actividad con el co-factor añadido es despreciable frente a este parámetro. Por lo cual la presencia del co-factor no afecta en gran medida la maximización del rendimiento final.

En bibliografía se ha descrito que el agregado en las concentraciones óptimas (1.4 μm) estimula la actividad, siendo ésta 3 veces en magnitud superior a la actividad medida en ausencia del mismo⁴, lo cual no concordó con lo observado en este trabajo. La actividad de la enzima con el agregado del co-factor en las concentraciones publicadas fue sólo 1.1 veces superior a la actividad de la misma sin su agregado. Debido al elevado costo del co-factor y al efecto despreciable en la

⁴ Hamamoto, T.; Noguchi, T.; Midorikawa, Y.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998, 6, 1103

actividad así como en el rendimiento de la reacción se decidió no agregarlo al medio de reacción en los subsiguientes ensayos.

vi) Efecto de la concentración de Mn^{+2} sobre el rendimiento y la actividad.

Por último, se realizaron ensayos en los cuales se modificó la concentración de Mn^{+2} , observándose que la misma no afectó los valores de actividad enzimática. Lo que se vio modificado fue el rendimiento de la reacción, siendo mayor al incrementarse la concentración del ión (0–1 mM). Estos resultados muestran que la concentración de Mn^{+2} presente en la solución de almacenamiento de la enzima es suficiente para maximizar el parámetro de actividad. Una posible explicación del aumento del rendimiento de la reacción con el incremento del ión divalente en el medio de reacción puede ser la formación del par iónico $Mn^{+2}HPO_4^{2-}$, que aboliría el efecto inhibitorio del fosfato inorgánico. El valor de actividad no se vio afectado por el ión divalente en exceso, debido a que este parámetro se mide a través de los valores de velocidad inicial, en donde la proporción de fosfato inorgánico formado como subproducto es muy pequeña. Esto explicaría el rendimiento máximo observado a concentraciones de ribosa 5-fosfato de 1 mM, con el agregado de 1 mM de Mn^{+2} . En las siguientes secciones se describen ensayos en los cuales el aumento de la concentración de este ión maximiza el rendimiento a mayores concentraciones del sustrato

Podemos concluir que las condiciones óptimas para llevar a cabo la reacción son las siguientes: pH 7, temperatura óptima de 45°C, concentración de β -mercaptoetanol de 200 mM, concentración del sustrato ribosa 5-fosfato 1 mM y concentración de Mn^{+2} 1 mM. Se obtuvo mediante el uso de estas condiciones una actividad específica de 87 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg prot}$, y un rendimiento del 90 % (30 h).

4.3- Conclusiones

Se logró obtener con elevado rendimiento y alta pureza, la PPM de *E. coli*, utilizando metodologías usuales de biología molecular.

Se evaluaron asimismo, los parámetros que optimizaran la actividad enzimática así como el rendimiento de la reacción modelo de síntesis de nucleósidos que involucró la formación de adenosina a partir de ribosa 5-fosfato y adenina, utilizando como biocatalizador el sistema acoplado formado por la PPM sobreexpresada y la PNP comercial.

De esta forma se determinó que la utilización de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados con resinas de tipo NTA para la purificación de la enzima sobreexpresada es una estrategia adecuada, a diferentes escalas, para la obtención de proteínas recombinantes con un alto grado de pureza en un solo paso de purificación. La diálisis contra una solución concentrada del agente quelante EDTA, permitió incrementar la actividad específica de la PPM, a través de un mecanismo de intercambio de iones metálicos en el centro activo de la enzima. El proceso de desnaturalización-renaturalización permitió solubilizar la enzima y proporcionó un medio para el correcto plegamiento de la proteína, aumentando asimismo la actividad específica.

Por último se determinaron las condiciones experimentales óptimas de la reacción, evaluando de forma independiente las posibles variables que afectan la actividad enzimática del sistema acoplado y el rendimiento de la reacción.

Capítulo 5

Síntesis quimio-enzimática de nucleósidos naturales y modificados

5.1- Objetivos y resumen

Este capítulo tiene como objetivo demostrar el alcance de la estrategia quimio-enzimática de síntesis de nucleósidos tanto naturales como modificados, utilizando como biocatalizador el sistema enzimático acoplado formado por la enzima recombinante PPM, obtenida como se describió en el capítulo 4, y nucleósido fosforilasas (NPs) comerciales, partiendo de pentosas 5-fosfato (capítulo 3) y bases purínicas y pirimidínicas.

Mediante esta metodología se sintetizaron, nucleósidos naturales, tales como la adenosina, inosina, guanosina, timidina y 2'-desoxiuridina, partiendo de ribosa 5-fosfato y/o 2-desoxirribosa 5-fosfato, según corresponde, y las bases naturales adenina, hipoxantina, guanina, timina y uracilo, respectivamente.

Asimismo, con el objeto de enfatizar la versatilidad del método en la obtención de nucleósidos modificados, se utilizó esta metodología para la preparación de análogos de nucleósidos, modificados tanto en la base como en el esqueleto azucarado del mismo. Por lo que se prepararon nucleósidos de arabinosa (modificados en el azúcar), así como nucleósidos de ribosa y 2-desoxirribosa, utilizando las bases modificadas purínicas: 6-mercapto purina, 6-cloro-2-aminopurina, 2-fluoroadenina y 1,2,4-triazol-3-carboxamida, y las bases modificadas pirimidínicas: 5-fluorouracilo y 5-bromouracilo.

5.2- Resultados y discusión

5.2.1- Esquema general de la síntesis enzimática de nucleósidos

A continuación se describe el esquema general de la síntesis enzimática de nucleósidos. El primer paso consiste en la migración regio y estereoselectiva del 5-fosfato a la posición α -1 de la pentosa. La pentosa 1-fosfato generada en este paso, es sustrato de otra enzima, la nucleósido fosforilasa. Este tipo de enzimas catalizan la reacción reversible de glicosidación de ribo y 2-desoxirribosa 1-fosfato en presencia de bases, para generar así, el nucleósido y fosfato inorgánico.

La reacción enzimática acoplada está limitada por la especificidad de la PPM y las NPs. Se ha reportado que la PPM de *E. coli* expresada acepta como sustratos la D-ribosa 5-fosfato, 2-desoxi-D-ribosa 5-fosfato y D-arabinosa 5-fosfato¹. Las NPs que se utilizaron para la reacción de acoplamiento fueron la Purín Nucleósido Fosforilasa (PNP) bacteriana comercial (Sigma) y la Timidín Fosforilasa (TP) comercial de *E. coli* (Sigma), las cuales aceptan como sustratos nucleósidos purínicos y pirimidínicos, respectivamente. Las bases se seleccionaron en base a la accesibilidad comercial de los nucleósidos modificados sintetizados a partir de las mismas, para así poder contar con material de referencia para determinar la identidad cromatográfica, el rendimiento y la cinética de los nucleósidos obtenidos.

5.2.2- Síntesis enzimática de ribonucleósidos.

Se sintetizaron diversos ribonucleósidos utilizando D-ribosa 5-fosfato y diversas bases como sustrato, y como biocatalizador, el sistema enzimático acoplado formado por la PPM y PNP, aplicando las condiciones optimizadas discutidas previamente en el capítulo 4.

En primer lugar se sintetizaron los ribonucleósidos naturales adenosina, inosina y guanosina. La base natural hipoxantina fue rápidamente convertida a inosina cuantitativamente (2 h, 45, Figura 5.1). Cuando se utilizó adenina la actividad relativa fue menor pero se obtuvieron, igualmente, altos rendimientos a mayores tiempos de reacción (46, Figura 5.1). Finalmente, la reacción enzimática de síntesis de guanosina ocurrió con un rendimiento del 30 % y una actividad relativa similar a la síntesis de adenosina. Los valores de actividad se expresaron en forma relativa, asignando el valor del 100 % a la actividad de la reacción de síntesis de inosina.

¹ Hammer-jespersen, K.; Petersen, A.; *Eur. J. Biochem.*, 1970, 17, 397

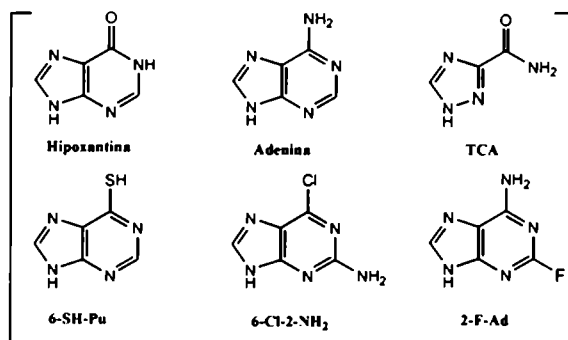
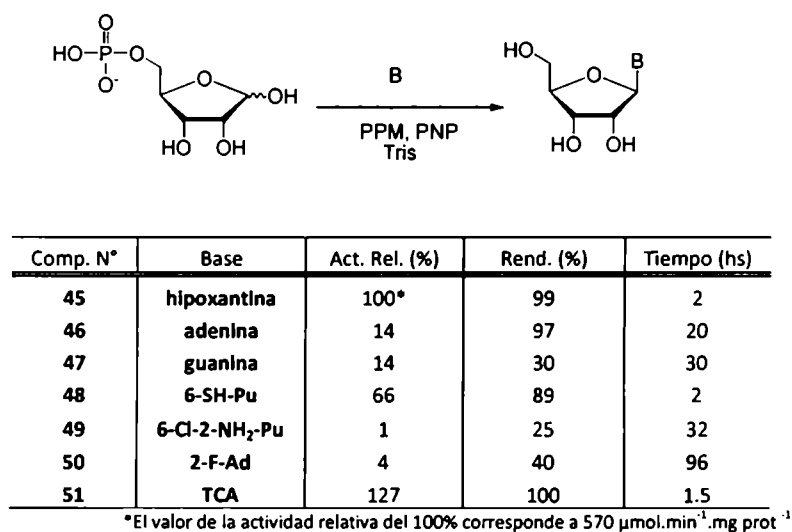


Figura 5.1. Reacción de transglucosidación enzimática utilizando D-ribosa 5-fosfato y bases.

La diferencia entre las actividades de las reacciones de síntesis de adenosina e inosina, se debió principalmente a la especificidad de la PNP utilizada en esta reacción. La PNP comercial utilizada en estos ensayos (Sigma, St.Louis, MO, USA) no cuenta con una especificación de origen. Si bien el rótulo indica "origen bacteriano", no se aclara el microorganismo. En trabajos previos se presumió que el origen de la PNP comercializada por Sigma era de *E. coli*. Esta enzima pertenece a la clase de PNP de alto peso molecular, y acepta como sustratos tanto 6-oxo como 6-aminopurinas. En cambio, las PNP del tipo de bajo peso molecular aceptan como sustratos solo 6-oxopurinas y en algunas excepciones 6-aminopurinas con menor actividad. Se ha sugerido recientemente que la enzima comercializada por Sigma no es de *E. coli* sino probablemente de

*Cellulomonas*². La PNP de *Cellulomonas* es del tipo de bajo peso molecular. Se ha reportado que la fosforólisis de adenosina no es detectable utilizando esta enzima, mientras que la adenina sí es sustrato de la reacción de síntesis de nucleósidos. Con el objeto de determinar el origen de la PNP, y de esta forma evaluar la especificidad de la misma durante este trabajo de tesis, se han realizado ensayos de fosforólisis de adenosina e inosina utilizando la PNP comercial, observando que la inosina se hidroliza rápidamente mientras que la adenosina no es sustrato de esta enzima. Asimismo, se ha estimado el peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida (aprox. 100 kDa, dato no mostrado). Este dato junto con la preferencia de esta enzima por hipoxantina sobre adenina (Figura 5.1), sugiere que esta enzima pertenece a la familia de PNP de bajo peso molecular, posiblemente de *Cellulomonas*, como se ha propuesto previamente.

Con respecto al bajo rendimiento obtenido en la síntesis de guanosina, éste se puede explicar debido a la baja solubilidad en solución acuosa de la base guanina.

Luego se examinaron diversas purinas sustituidas para explorar la generalidad del método propuesto. De esta forma se ensayaron las bases 6-mercaptopurina, 6-cloro-2-aminopurina, 2-fluoroadenina y 1,2,4-triazol-3-carboxamida. Aunque los valores de actividad y rendimiento fueron aceptables para la preparación del 6-mercaptopurín ribonucleósido (48, Figura 5.1), los resultados en el caso del 6-cloro-2-aminopurín ribonucleósido (49, Figura 5.1) y 2-fluoroadenín ribonucleósido (50, Figura 5.1) no fueron tan positivos. Esto se debió a la alta especificidad en relación a las bases de las PNP de bajo peso molecular. Un ejemplo interesante es la síntesis del antiviral Ribavirina (Virazole) a partir de la base no convencional triazólica, 1,2,4-triazol-3-carboxamida (51, Figura 5.1). La reacción procedió cuantitativamente con alta actividad (1.5 h). Estudios cristalográficos por rayos X³ indican que el nucleósido triazólico es capaz de mimetizar la conformación de diversos ribonucleósidos purínicos canónicos. Como se observa en la Figura 5.2, el oxígeno y el nitrógeno del grupo 3-carboxamida se encuentran espacialmente ubicados de forma similar a los átomos O6 y N1 de la inosina y guanosina. Por rotación (180 °) del enlace C3-C6, la ribavirina también se asemeja a la conformación de la adenosina (Figura 5.2). Esto explicaría la aceptación como sustrato de esta base no convencional triazólica por la enzima.

² Bzowska, A.; Kulilowska, E.; Shugar, D.; *Pharmacol. & Therap.*, 2000, 88, 349

³ Wu, J.; Lin, C.; Hong, Z.; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52, 543

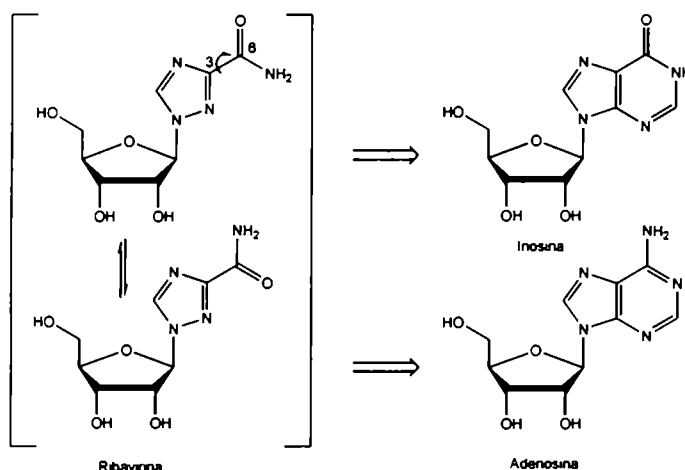


Figura 5.2. Diversas conformaciones de la ribavirina y su similitud con los ribonucleósidos naturales.

5.2.3- Síntesis enzimática de 2'-desoxirribonucleósidos

A continuación, se utilizó la 2-desoxirribosa 5-fosfato como sustrato de la PPM y la TP de *E. coli*, para la reacción de síntesis enzimática de 2'-desoxirribonucleósidos, tanto naturales como modificados, en conjunto con las bases pirimidínicas: timina, uracilo, 5-fluorouracilo y 5-bromouracilo (52-55, Figura 5.3). Asimismo, con el objeto de evaluar la especificidad de la PNP por el sustrato 2-desoxirribósido, se decidió comparar las cinéticas y los rendimientos de las reacciones de síntesis de desoxirribonucleósidos purínicos, empleando para este ensayo una base purínica natural, hipoxantina, así como una modificada, 6-mercaptopurina (56-57, Figura 5.3). Las velocidades de reacción se expresaron relativas a la síntesis de inosina, como se ha descrito en la Figura 5.1.

Como se muestra en la Figura 5.3, se observaron altos rendimientos y actividades en la síntesis de 2'-desoxirribonucleósidos pirimidínicos, en todos los casos ensayados. Como se ha descrito en bibliografía, la TP es específica con respecto a los azúcares, para la 2-desoxirribosa 1-fosfato, mientras que la especificidad por las bases pirimidínicas es más laxa. Se ha reportado que la posición 5 del anillo pirimidínico puede ser intercambiada por hidrógeno, metilo o amino con efectos despreciables en los valores de actividad⁴. En el caso de la síntesis de nucleósidos

⁴ a) Razzel, E.; Khorana, H.; *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, 28, 562; b) Razzel, E.; Casshyap, P.; *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 1789

utilizando bases tipo 5-halogenouracilo, se determinó que disminuye significativamente la actividad en comparación con la utilización de timina⁵. Este efecto puede deberse al reemplazo del grupo en la posición 5 por un sustituyente voluminoso, dificultando estéricamente la unión de la base modificada al centro activo de la TP (54 y 55, Figura 5.3).

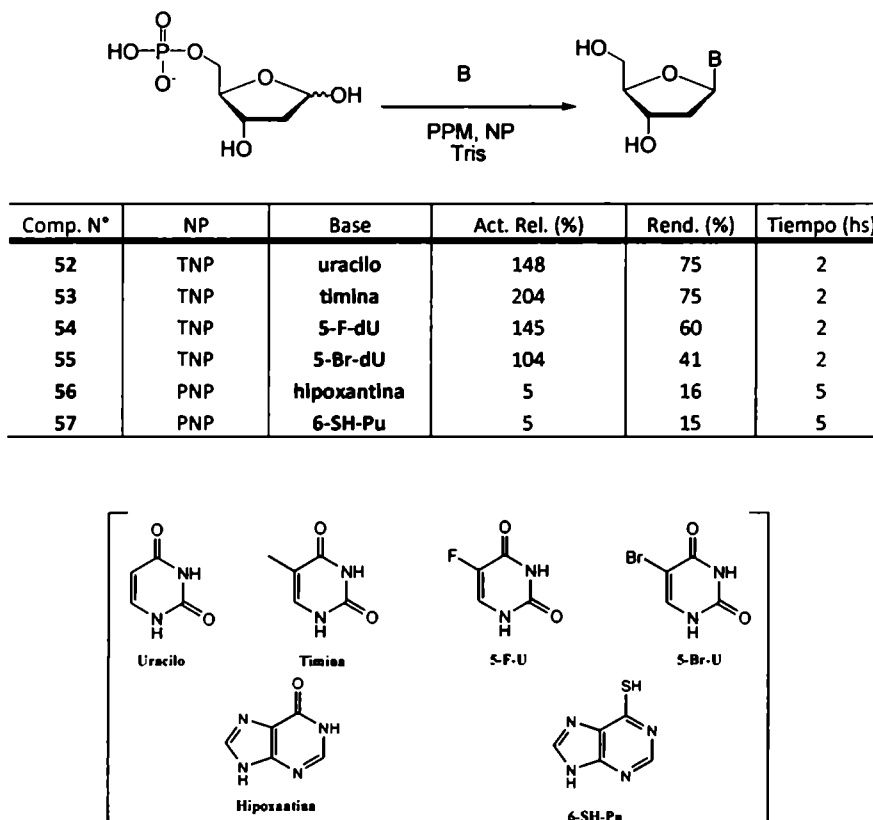


Figura 5.3. Reacción de transglucosidación enzimática utilizando 2-desoxi-D-ribosa 5-fosfato y bases.

En el caso de la preparación del compuesto 55 (Figura 5.3) mediante el uso de las condiciones de reacción óptimas descritas en el capítulo 4, se observó la aparición del producto de reacción deshalogenado en la posición 5, la 2'-desoxiuridina (---, Figura 5.5), junto con el producto deseado, 5-bromo-2'-desoxiuridina (—, Figura 5.5). Una posible explicación de la aparición de este producto secundario puede ser la formación del nucleósido desbromado

⁵ Panova, N.; Alexeev, C.; Kusmichov, A.; Shchevelva, E.; Gavryshov, K.; Polyakov, A.; Kritzyn, A.; Esipov, R.; Miroshnikov, A.; *Biochemistry*, 2007, 72, 21

mediante una reacción de deshalogenación química, tanto en la base (5-bromouracilo) como en el nucleósido (5-bromo-2'-desoxiuridina), promovida por el β -mercaptoetanol (200 mM) presente en el medio de reacción. Al ser el bromo localizado en la posición C-5, un grupo atractor de electrones, se verá incrementada la reactividad del C-6 para reacciones de adición nucleofílica. Por lo que se propone como posible mecanismo de la formación del subproducto desbromado, en primer lugar, el ataque nucleofílico del β -mercaptoetanol a la posición C-6, formándose dos posibles intermediarios tiólicos (**6-TU** y **5,6-TU**, **Figura 5.4**). Luego, al ser ahora el grupo halógeno en la posición C-5, un grupo saliente muy activo en los intermediarios, se propone la formación del producto final mediante reacciones de eliminación de los sustituyentes azufrados.

Se han reportado reacciones similares del 5-bromo-2'-desoxiuridina (**5-Br-U**, **Figura 5.4**) con cisteína, en las cuales se ha explicado la formación de 2'-desoxiuridina (**U**, **Figura 5.4**) por eliminación de disulfuro de hidrógeno a partir de los intermediarios 6-tiol (**6-TU**, **Figura 5.4**) y 5,6-ditio (**5,6-DTU**, **Figura 5.4**) formados por adición nucleofílica del compuesto azufrado al 5-bromo-2'-desoxinucleósido⁶.

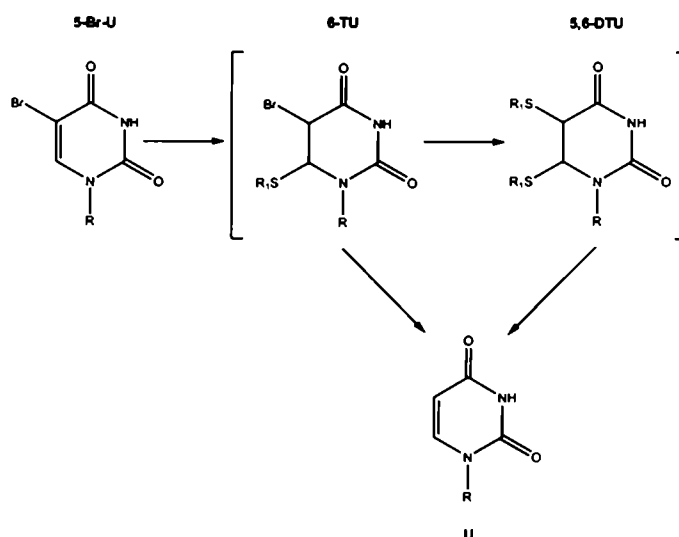


Figura 5.4. Reacción de deshalogenación química promovida por compuestos azufrados.

Con el objeto de maximizar el rendimiento de la reacción de síntesis del 5-bromo-2'-desoxiuridina, se evaluó el efecto de la concentración del β -mercaptoetanol en los valores de

⁶ Ver por ejemplo: a) Szabo, L.; Kalman, T.; Bardos, T.; *J. Org. Chem.*, **1970**, 35, 1434, b) Pal, B.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1978**, 100, 5170; c) Chikuma, T.; Negishi, K.; Hayatsu, H.; *Chem. Pharm. Bull.*, **1973**, 95, 2312

dicha variable. Como se observa en la **Figura 5.5**, mientras que la actividad relativa (se considera 100 % el valor de máxima actividad) aumenta con el incremento del agente reductor, como se describió previamente en el capítulo 4, el rendimiento alcanza un valor máximo a 50 mM de β -mercaptoetanol, obteniéndose la 5-bromo-2'-desoxiuridina con un 100 % de rendimiento.

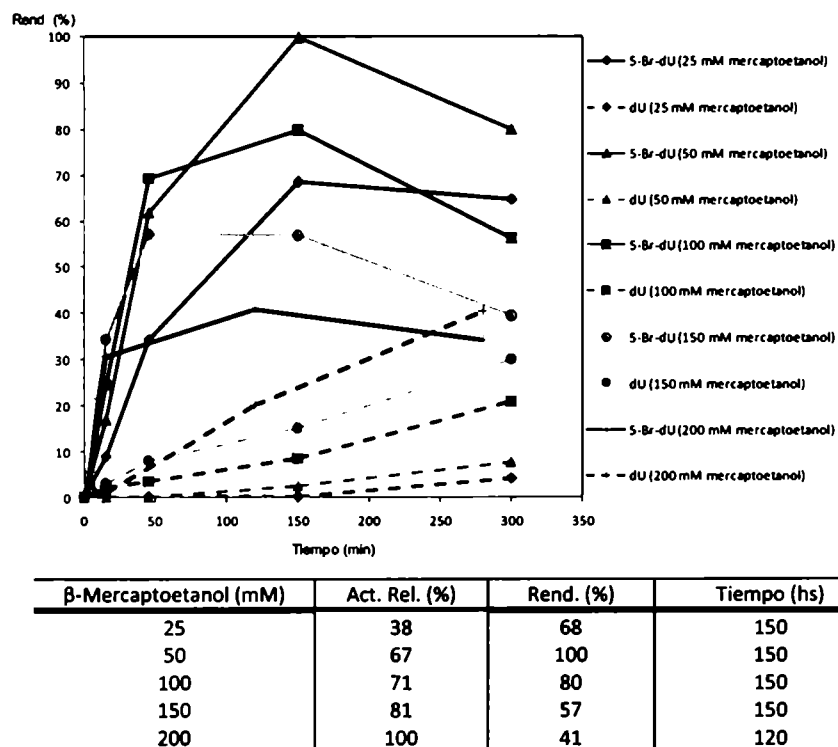


Figura 5.5. Efecto de la concentración de β -mercaptoetanol en la síntesis de 5-bromo-2'-desoxiuridina.

El incremento en la concentración de β -mercaptoetanol, aumenta la proporción del nucleósido 2'-desoxiuridina en la mezcla de reacción (---, **Figura 5.5**), obteniéndose de esta forma, rendimientos menores con el aumento de la concentración del agente reductor.

Finalmente, se evaluó la actividad y el rendimiento de la reacción de síntesis de 2'-desoxinucleósidos purínicos, empleando dos bases purínicas: hipoxantina y 6-mercaptopurina. Ambos casos dieron resultados desalentadores, observándose en ambas reacciones rendimientos aproximadamente del 15%, así como actividades inferiores a las obtenidas en el caso de la síntesis de nucleósidos pirimidínicos. Esto se debió, posiblemente, a la especificidad de la PNP de bajo peso molecular con respecto a los azúcares 1-fosfato.

5.2.4-Síntesis enzimática de arabinonucleósidos

Finalmente, se utilizó arabinosa 5-fosfato como sustrato para la reacción de glicosidación catalizada por la PPM y PNP con hipoxantina, adenina, 6-mercaptapurina y 1,2,4-triazol-3-carboxamida (**58-61**, **Figura 5.6**). Ha sido reportado previamente⁷ que los arabinonucleósidos son sustratos menos activos que los correspondientes nucleósidos ribósidos en las reacciones de hidrólisis utilizando PNP. En esa publicación se ha justificado este hecho experimental mediante el empleo de experimentos *in silico*, demostrándose en los mismos, la ausencia de uniones puente de hidrógeno entre el hidroxilo en la posición 2 del esqueleto arabinósido y los aminoácidos del sitio activo de la enzima. Esta asunción podría explicar las bajas actividades y rendimientos obtenidos para las reacciones de síntesis de arabinonucleósidos, así como también podría explicar la baja actividad observada en el caso de los ensayos realizados con desoxirribosa 5-fosfato. Sólo el compuesto **58** (**Figura 5.6**) fue obtenido con un rendimiento del 46%, debido a que es el sustrato (hipoxantina) más activo para esta enzima. Posteriormente, se ensayó la síntesis del nucleósido **58** (**Figura 5.6**), variando la cantidad de arabinosa 5-fosfato, con el objeto de evaluar la cinética del sistema enzimático acoplado en la síntesis de dicho nucleósido. Como se puede observar en la **Figura 5.7**, la velocidad inicial aumenta en forma lineal con el aumento de la concentración de sustrato (si se supone cinética del tipo de Michaelis Menten, no se ha alcanzado el valor de velocidad máxima a las concentraciones de sustrato analizadas). Sin embargo el rendimiento de la reacción alcanza un valor máximo en todos los casos analizados, posiblemente debido al efecto inhibitorio del fosfato inorgánico liberado como subproducto de la reacción.

⁷ Bennet, E.; Li, C.; Allan, P.; Parker, P.; Ealick, S. ; *J.Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 47110

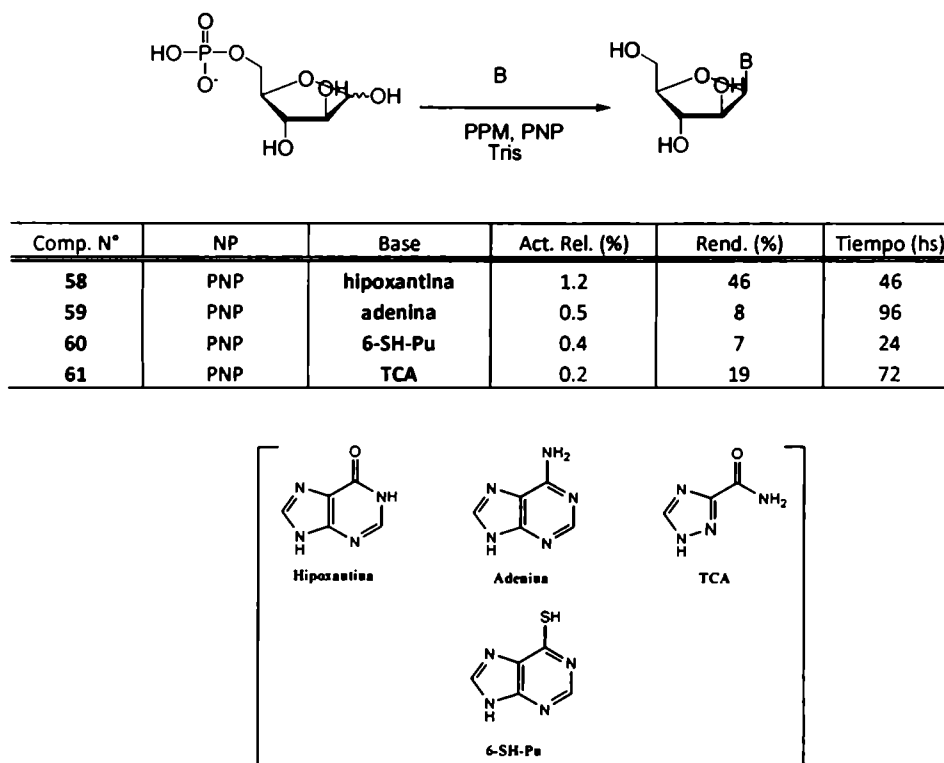


Figura 5.6. Reacción de transglucosidación enzimática utilizando D-arabinosa 5-fosfato y bases.

Para maximizar los valores de actividad y rendimiento de la reacción de síntesis de arabinonucleósidos, se debería acoplar la PPM sobreexpresada en nuestro laboratorio con NPs de diversos orígenes, con el objeto de hallar la NP que acepte en mayor medida D-arabinosa 1-fosfato como sustrato. Diversos estudios realizados por nuestro grupo⁸ demostraron que es posible sintetizar arabinonucleósidos utilizando células enteras de *E coli* BL21. Por lo que se proyecta, en un futuro, ensayar la síntesis de arabinonucleósidos utilizando como biocatalizador el sistema enzimático acoplado formado por la PPM y células enteras de *E. coli* BL21.

⁸ Rogert, M.; Martínez, N.; Porro, S.; Lewkowicz, E.; Iribarren, A.; *Molecules*, 2000, 5, 535.

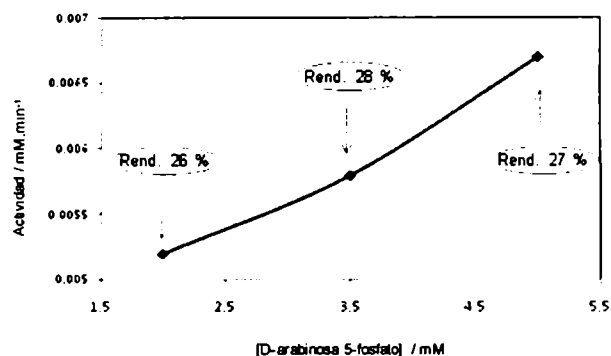


Figura 5.7. Efecto de la concentración de arabinosa 5-fosfato en la velocidad inicial de la reacción de síntesis del nucleósido Ara-I.

5.3- Conclusiones

Se ha demostrado exitosamente la versatilidad de la estrategia quimioenzimática de síntesis de nucleósidos tanto naturales como modificados, utilizando como biocatalizador el sistema enzimático acoplado (PPM + NPs), partiendo de las pentosas 5-fosfato sintetizadas previamente y bases comerciales.

De esta forma se han obtenido con altos rendimientos (70-100%) los nucleósidos: adenosina, inosina, 6-mercaptopurín ribonucleósido, 1,2,4-triazol-3-carboxamida ribonucleósido (Rivabirina), timidina, 2'-desoxiuridina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina y 5-bromo-2'-desoxiuridina. Asimismo se han obtenido diversos nucleósidos con moderados rendimientos (30-50%), tales como la guanosina, 2-amino-6-cloro-purín ribonucleósido, 2-fluoroadenosina y hipoxantín arabinonucleósido. Finalmente se han obtenido con bajo rendimiento (10-30%) los siguientes nucleósidos: adenín arabinonucleósido, 6-mercaptopurín arabinonucleósido, 1,2,4-triazol-3-carboxamida arabinonucleósido, 2'-desoxiinosina y 2-amino-6-cloropurín 2'-desoxirribonucleósido.

Resta ensayar la síntesis de nucleósidos arabinósidos utilizando purín nucleósido y/o timidín fosforilasas de diversos orígenes.



Capítulo 6

Inmovilización de la PPM y co-inmovilización de la PPM y PNP

6.1- Objetivos y resumen

Este capítulo tiene como objetivos la inmovilización eficiente de la enzima sobreexpresada para este trabajo de tesis (PPM), y la co-inmovilización del sistema enzimático acoplado (PPM-NP) utilizado en la síntesis de nucleósidos naturales y/o modificados, como se describe en el capítulo 5. El objeto de este proceso es la obtención de un biocatalizador eficiente para potenciales aplicaciones tecnológicas.

Para lograr este objetivo, se han analizado diversas metodologías de inmovilización, así como diversos soportes. En particular se estudió la factibilidad técnica de inmovilizar dichas enzimas por encapsulación en soportes vítreos híbridos (SiO_2 + polímero), elaborados mediante tecnología sol-gel, utilizando como precursores: tetraetilortosilicato (TEOS) y tetra(2-hidroxietil)ortosilicato (THEOS), y como auxiliares poliméricos: alcohol polivinílico y quitosano. Se trataron los mismos por el proceso denominado ISISA (*Ice-Segregation-Induced-Self-Assembly*), con el objeto de crear materiales híbridos jerárquicos con mejores propiedades mecánicas y de transporte de masa.

6.2- Resultados y discusión

6.2.1- Selección de la técnica de inmovilización

Se realizaron una serie de experimentos preliminares, con el objeto de explorar qué estrategia de inmovilización (unión covalente, adsorción o atrapamiento) era la más adecuada para la enzima de interés (PPM). Los ensayos fueron realizados inmovilizando únicamente esta enzima, dejando en solución la NP correspondiente. Se utilizó como ensayo modelo, para evaluar la actividad del nuevo biocatalizador obtenido, la conversión de ribosa 5-fosfato e hipoxantina a inosina.

En primer lugar se evaluó la estrategia de inmovilización por unión covalente de la enzima a un soporte sólido. Para estos ensayos se seleccionó, en primer lugar, un soporte comercial denominado amino sefarosa (GE, Healthcare Life Sciences) que contiene grupos aminos

disponibles unidos, a través de un espaciador de brazo largo, a una resina de agarosa entrecruzada. El acoplamiento de la enzima al soporte se realizó por medio de la activación de los grupos carboxilos de la enzima con una carbodiimida soluble en agua (1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida, EDC), quedando unida la misma al soporte por medio de la formación de enlaces amida. Se ensayaron diversas condiciones variando la proporción enzima:resina, utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. Se observó, en todos los casos analizados, que la enzima inmovilizada se inactivaba por esta metodología. Esta inactivación de la PPM puede deberse a la posible presencia de grupos carboxilos en el sitio activo de la enzima que reaccionaron con este agente, alterándose la estructura de dicho sitio. Debido a esta suposición, se intentó inmovilizar la enzima mediante la activación del soporte, utilizándose para esto glutaraldehido como agente activante. Esta inmovilización nuevamente condujo a biocatalizadores inactivos. Por este motivo se reemplazó la resina de amino sefarosa por perlas de quitosano para intentar lograr la inmovilización por adsorción. Asimismo se intentó inmovilizar la enzima a este soporte por unión covalente con los agentes activantes mencionados anteriormente.

El quitosano es un polisacárido lineal compuesto por dos tipos de unidades estructurales distribuidas de manera aleatoria a lo largo de la cadena, la *N*-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina, las cuales se encuentran unidas entre sí por enlaces del tipo $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicos. El quitosano es soluble en soluciones acuosas ácidas ($\text{pH} < 6$), encontrándose cargado positivamente en dichas soluciones. Las perlas se prepararon utilizando el método de neutralización que consiste en la precipitación del quitosano, al poner en contacto una solución ácida de este polímero con álcali y etanol. Este último se agrega para facilitar la precipitación de las perlas de quitosano, debido a la baja solubilidad del polímero en este solvente. Para llevar a cabo la inmovilización, en primer lugar, se prepararon las perlas de quitosano por goteo, a velocidad controlada, de una solución ácida de quitosano (2.5% en ácido acético 0.3 M, $\text{pH}=4.5$) sobre una solución 1 M de NaOH que contenía 26 % (v/v) etanol. Para lograr el tamaño y la forma deseado de las perlas se procedió al goteo mediante el uso de una jeringa con presión positiva constante. Las perlas de quitosano se mantuvieron en la solución de NaOH/etanol para permitir el endurecimiento de las mismas. Una vez logrado esto, se lavaron exhaustivamente con agua destilada hasta pH neutro y con diversas soluciones amortiguadoras. Se realizaron dos procedimientos diferentes para lograr la inmovilización de la enzima sobre este soporte:

- Inmovilización por unión covalente: Se trabajó con dos agentes activantes para modificar el soporte: la carbodiimida (EDC) para la activación de los grupos hidroxilo y el glutaraldehído para la activación de los grupos amino
- Inmovilización por adsorción: se intentó aprovechar la alta afinidad de este soporte por las proteínas.

Con el tratamiento con glutaraldehído no se obtuvieron biocatalizadores activos, al igual que para la inmovilización sobre el soporte de aminosefarosa. En cambio, los biocatalizadores obtenidos con la carbodiimida y sin el uso de agente activante brindaron resultados positivos y similares. Esta similitud en la actividad de los biocatalizadores obtenidos por las dos estrategias de inmovilización mencionadas sugiere que la PPM no se ha unido covalentemente al soporte, sino que fue adsorbida sobre el soporte debido a la alta afinidad de éste por las proteínas.

La suposición de que la enzima se haya adsorbido sobre el soporte y no se encuentre unida covalentemente se basa en que sólo se ha encontrado un reporte en bibliografía que demuestre el uso de carbodiimidias para la activación de grupos hidroxilos¹ en soportes derivados del quitosano, siendo ésta utilizada casi exclusivamente para la activación de carboxilos.

Se decidió repetir el ensayo de inmovilización de la PPM por adsorción para verificar su reproducibilidad. Se obtuvieron valores de actividad de diversa magnitud, mostrando la pobre reproducibilidad de este biocatalizador. Se intentaron cambiar parámetros para obtener resultados más constantes pero no se logró la reproducibilidad buscada.

Siendo infructuosos los intentos de inmovilización de la PPM mediante la metodología de unión covalente y adsorción, se decidió modificar la estrategia evaluándose la inmovilización por atrapamiento de la PPM en diversos materiales. Se decidió ensayar, en primer lugar, el atrapamiento en perlas de agar. Las mismas se prepararon por goteo a velocidad controlada de una solución enzimática en agar al 4 % (a 50 °C), sobre un baño de aceite de girasol comercial, seguido de un lavado exhaustivo del biocatalizador, para así remover los remanentes del aceite de girasol y acondicionarlo con la solución amortiguadora utilizada para medir la actividad enzimática. Se ensayó entonces la reacción modelo de síntesis de inosina. Se comparó luego la estabilidad operacional de la enzima inmovilizada en un proceso batch repetitivo. Aunque la actividad fue aceptable en el primer uso del biocatalizador ($250 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgprot}^{-1}$), cayó a un 18% de la inicial en el segundo uso y a un 1.7 % en el tercero. La disminución de la actividad del biocatalizador con los usos se debió presumiblemente a la lixiviación de la enzima de las perlas de agar.

¹ Chiou, S.; Wu, W.; *Biomaterials*, 2004, 25, 197

Considerando que un material con poros de menor tamaño podría ser una alternativa para resolver la pérdida de enzima por lixiviación, se ensayó la encapsulación de la PPM dentro de matrices de órgano-silicatos preparadas mediante la metodología de procesamiento sol-gel a bajas temperaturas (en forma de hidrogeles), con el posterior tratamiento del biomaterial para la obtención del xerogel, por la metodología ISISA², descrita en la introducción.

Se ha utilizado en este trabajo un sol de sílica acuoso sintetizado a partir del precursor TEOS, en el cual se ha añadido una entidad soluble, el alcohol polivinílico (PVA) previo a la polimerización del mismo. La mezcla del aditivo y sílica favorece la formación de entramados interpenetrados (IPN), debido a la condensación de los grupos silanoles con los hidroxilos del PVA, resultando en la formación de enlaces Si-O-C. Asimismo la adición de PVA, protege a la enzima de la inactivación (ésta puede deberse a la desnaturalización de la enzima por su interacción con los grupos silanoles del soporte), promueve la retención de moléculas de agua alrededor del biocatalizador, favorece los efectos de dispersión de las moléculas de enzima, facilitando de esta forma el transporte de masa, y por último actúa como crioprotector durante el congelamiento utilizado en el procesamiento del material. A su vez se obtienen materiales menos quebradizos que los obtenidos sin su agregado.

Con objeto de optimizar la estrategia de inmovilización, la actividad de la PPM fue ensayada utilizando un conjunto de sol-geles con diversas proporciones de TEOS y PVA, manteniendo constante la suma de ambos, en un valor igual a 8 %³.

La disminución en el contenido de PVA con el consecuente aumento del porcentaje de TEOS afectó profundamente la actividad de la PPM (Tabla 6.1). Esto puede ser explicado por el efecto desnaturalizante de la sílice cargada negativamente sobre la estructura de la enzima y a los varios efectos protectores del auxiliar polimérico (PVA) anteriormente citados. Como se puede observar en la Tabla 6.1, la actividad es nula cuando el material es sintetizado sin el auxiliar polimérico y es máxima cuando éste es preparado sin el agregado de sílica, siendo la última, el 11 % de la actividad de la enzima en solución. También se pudo observar que los materiales preparados con sílica pura eran extremadamente quebradizos, tornándose más resistentes y gomosos a medida que se aumenta la proporción de PVA.

² Gutierrez, M.; Jobágy, M.; Rapun, N.; Ferrer, M.; Del Monte, F.; *Adv. Mater.*, 2006, 18, 1137

³ Long, J.; Hutcheon, G.; Cooper, A.; *J. Comb. Chem.*, 2007, 9, 399

N°	% TEOS	% PVA	Act. Rel. ^a	Rend. % (24hs)
1	8	0	0.00	0
2	6.4	1.6	0.02	43
3	4.8	3.2	0.05	47
4	4	4	0.06	56
5	3.2	4.8	0.07	60
6	1.6	6.4	0.11	58
7	0	8	0.11	53
8	0	0	1	88

^a Act. Rel. = actividad de la enzima inmovilizada /actividad de la enzima en solución.
La actividad de la enzima en solución fue de 572.5 μ M/min.mg proteína.

Tabla 6.1. Efecto del % de TEOS y del % de PVA en la actividad y en el rendimiento de la PPM inmovilizada en el sistema híbrido sílica/PVA.

Asimismo se midió la actividad de la enzima atrapada en los hidrogeles antes y después del procesamiento ISISA de los mismos, con el fin de estudiar el efecto de la exposición de la enzima a las bajas temperaturas utilizadas por esta metodología (-196°C). No se observó variación en las actividades relativas en este ensayo, por lo que es posible concluir que el procesamiento de los biomateriales a dichas temperaturas no afecta la actividad de la PPM, siendo el atrapamiento de la misma, la que disminuye la actividad con respecto a la enzima en solución.

Como se describió en el capítulo 4, la PPM posee un requerimiento absoluto del agente reductor β -mercaptoetanol. Este agente permite el plegamiento correcto de la estructura nativa de la proteína siendo, de esta forma, activa. En los ensayos preliminares descritos anteriormente la enzima era atrapada sin el agregado del agente reductor, siendo éste añadido directamente en el medio de reacción en los ensayos de actividad. Al encontrarse restringida la movilidad de la enzima por su encapsulación en los materiales porosos, se evaluó si parte de la pérdida de la actividad de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima en solución, se podía deber al atrapamiento de la enzima en su conformación no nativa, no recuperando la misma su estructura activa ante el posterior agregado de β -mercaptoetanol, por dicha restricción en su movilidad. Por lo que se decidió llevar a cabo los bioinmovilizados agregando, previo a la etapa de polimerización, el agente reductor, con el objeto de permitir el correcto plegamiento de la enzima antes de la confinación de la misma en el material poroso. La actividad de la PPM inmovilizada en estos soportes con el agregado del agente de reductor previo y posterior al paso de polimerización fue

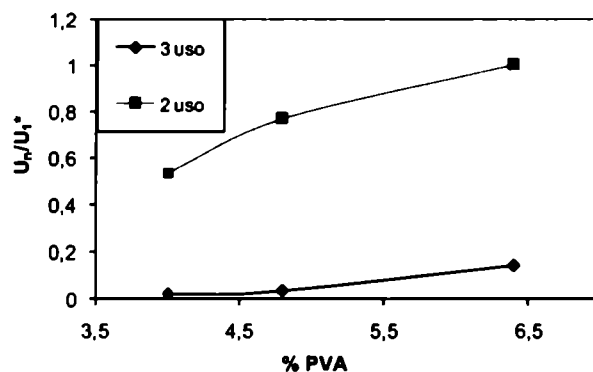
la misma. Esta similitud en las actividades de los biocatalizadores inmovilizados se puede deber a que los poros del material son lo suficientemente grandes para permitir la libre movilidad de la enzima, pudiendo adquirir su conformación nativa una vez inmovilizada. Por lo que la pérdida de actividad al ser inmovilizada no se debe a un incorrecto plegamiento dentro de la matriz del sol-gel.

Otros motivos por los cuales puede darse la pérdida de actividad de la enzima inmovilizada con respecto a la libre son:

- la lixiviación de la enzima del material por un tamaño de poro elevado
- una menor difusión de los reactivos y productos
- la interacción entre el soporte y la enzima
- la liberación de etanol (desnaturalizante para las enzimas) producida en la etapa de hidrólisis del precursor TEOS.

A continuación, se evaluó la estabilidad operacional de los sistemas inmovilizados, analizando la actividad y el rendimiento de la reacción de síntesis de inosina, a través de los repetidos usos de los biocatalizadores obtenidos.

Se evaluaron los biomateriales que dieron los mejores valores de actividad en el ensayo preliminar (Tabla 6.1, condiciones experimentales de las entradas N° 4, 5, 6 y 7). La actividad disminuyó en todos los casos analizados con el re-uso de los biocatalizadores (Figura 6.1) hasta ser nula en el cuarto uso (dato no mostrado), probablemente debido a la lixiviación de la enzima debido a la desintegración parcial del soporte.



* U_n/U_1 : Actividad de la PPM inmovilizada en el uso n/ actividad de la enzima inmovilizada en el primer uso

Figura 6.1. Estabilidad operacional de la PPM inmovilizada en el sistema híbrido sílica/PVA

De todas las estrategias analizadas, se concluyó que la inmovilización por atrapamiento de la PPM en soportes vítreos híbridos, elaborados mediante tecnología sol-gel, con el posterior procesamiento mediante la metodología denominada ISISA era la más prometedora. En este sentido, se decidió intentar optimizar el tamaño de poro (por variación del precursor y del polímero auxiliar) para aumentar la estabilidad operacional del biocatalizador inmovilizado y la actividad de la enzima inmovilizada, y desarrollar precursores “libres de etanol” para así mejorar las propiedades de la enzima atrapada.

6.2.2- Inmovilización en compuestos híbridos de quitosano-sílica por la tecnología sol gel.

Recientemente se han encontrado metodologías para el procesamiento de los sol-geles biocompatibles y más suaves que las descritas anteriormente en este capítulo. Las mismas se basan en el uso de precursores modificados para la inmovilización de proteínas activas. Las principales desventajas del procesamiento utilizando como precursor TEOS, son la presencia del etanol liberado durante la hidrólisis y la necesidad de cambios abruptos en el pH para el inicio de la etapa de polimerización, ambos posibles efectos perjudiciales en la actividad de la enzima atrapada. Para solucionar los mismos se desarrollaron nuevos precursores biocompatibles, como el THEOS. La liberación de un alcohol “amigable” a la enzima atrapada (etilenglicol) disminuye la posible desnaturalización proteica. Otra ventaja de estos precursores es que pueden ser disueltos directamente en agua y condensan a pH neutros, eliminando la necesidad de alteraciones abruptas en el pH durante el procesamiento del gel⁴. Estos materiales de partida, asimismo, generan materiales con menor grado de encogimiento, menor diámetro de poro y propiedades mecánicas mejores que los materiales basados en TEOS⁵. En particular el precursor modificado THEOS puede ser preparado fácilmente por medio de reacciones de transesterificación del TEOS con etilenglicol.

Con el objeto de obtener materiales mecánicamente más resistentes, y de menor tamaño de poro se modificó, asimismo, el auxiliar polimérico adicionando a los sol-geles de sílica, quitosano en lugar de PVA. Es sabido que la presencia de quitosano, una molécula policatiónica,

⁴ Chery, H.; Tameki, R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 10063

⁵ Brandhuber, D.; Torma, V.; Raab, C.; Peterlik, H.; Kulak, A.; Husing, N. *Chem. Mat.*, **2005**, *17*, 4262

puede actuar como agente nucleante para la sílica, debido a la formación de enlaces puente de hidrógeno entre los grupos aminos del quitosano y los hidroxilos de los silanoles⁶.

6.2.2.1- Obtención y caracterización del precursor THEOS

Se obtuvo el precursor THEOS mediante una reacción de transesterificación del TEOS con etilenglicol (**Figura 6.2**). Fue posible directamente reemplazar al grupo etoxilo en el TEOS, sin el uso de catalizadores. A la vez, este diol fue sometido a la mencionada reacción de transesterificación sin la necesidad de solventes. La reacción se llevó a cabo bajo atmósfera inerte a 150°C utilizando directamente TEOS y etilenglicol, recién destilados, con remoción de subproducto formado, etanol (por destilación), para así permitir el avance de la reacción. Se consideró la reacción finalizada, cuando se halló la misma estequiométricamente balanceada, esto es, cuando los equivalentes de etanol liberados igualaron aproximadamente a los grupos etoxilos en el material de partida. Asimismo, se demostró espectroscópicamente el intercambio completo del alcohol, debido a que, en general, no se evidenciaron grupos etoxilos en los espectros de RMN de ¹H y ¹³C. Una vez alcanzado el rendimiento máximo, se removió el remanente de etilenglicol por destilación a presión reducida, para así obtener al THEOS como un aceite transparente, con un 80 % de pureza.

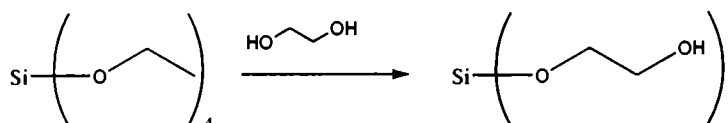


Figura 6.2. Preparación de THEOS.

La síntesis fue diseñada para minimizar la presencia de silanoles parcialmente condensados (siloxanos) en el producto final. Por ello, se destilaron ambos reactivos, para eliminar cualquier remanente de agua, para así obtener únicamente especies Q⁰. De lo contrario, la reacción de transesterificación sería acompañada por reacciones de hidrólisis y condensación, para dar las especies Q¹, Q² y Q³ en el producto (Qⁿ es una forma de expresar el grado de condensación de los tetraedros SiO₄, es decir, del número de átomos de oxígeno compartidos por dos tetraedros (o la conectividad entre tetraedros), donde n corresponde al número de átomos de

⁶ Wang, G.; Zhang, L.; *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110, 24864

oxígeno compartidos). Aunque, por limitaciones experimentales, no fue posible realizar experimentos de RMN de ^{29}Si para confirmar esta suposición. Al no ser necesario el uso de catalizadores para la transesterificación descrita, se evitó la contaminación posible de la sílica resultante.

El THEOS fue totalmente soluble en agua, con un tiempo de gelificación en solución acuosa neutra de varias horas, dependiendo de la concentración del precursor en la solución (a temperatura ambiente). Tal como se citó anteriormente las moléculas de quitosano actúan como centro de nucleación, acelerándose los tiempos de gelificación enormemente, efecto combinado con el aumento de pH. A concentraciones de quitosano constante (1%), el tiempo de gelificación dependió de la concentración del precursor, siendo de 8 minutos para una concentración de sílice del 12%, 6 minutos para 20% de sílice y de 3 minutos para 40% de sílice. Estos ensayos se realizaron con soluciones de buffer Tris pH=8 con una concentración final en la solución de 100 mM.

Por último cabe destacar que al mezclar el precursor THEOS con la solución acuosa ácida de quitosano, no se observó precipitación ni separación de fases, mostrando una buena compatibilidad.

6.2.2.2- Inmovilización de la PPM: Efecto de la concentración de THEOS y quitosano en la inmovilización por sol-gel.

Teniendo en cuenta que la polimerización del precursor THEOS es menos desnaturalizante que la análoga basada en TEOS, se evaluaron concentraciones más elevadas del precursor de partida. En primer lugar, se prepararon diversos sol-geles a concentración constante de quitosano, variando el porcentaje de THEOS entre un 10% y un 40%, fijando el pH de la inmovilización en un valor igual a 8. La concentración de quitosano en el material se vio limitada al encontrarse el mismo disuelto en una solución de pH ácido, lo cual podría afectar la actividad enzimática, por lo que dicha concentración fue fijada en un valor de 0.8% (Tabla 6.2).

En estos experimentos (Tabla 6.2) se observó que un aumento en el porcentaje de THEOS disminuía la actividad de la PPM inmovilizada. Esto puede ser explicado por el efecto desnaturalizante de la sílica cargada negativamente sobre la estructura de la enzima, como se citó anteriormente para el caso de la enzima inmovilizada en sol-geles basados en el precursor TEOS.

En segundo lugar, se estudió la influencia del contenido de quitosano en la actividad de la PPM inmovilizada, dejando constante la concentración de THEOS en el valor de máxima actividad obtenido en los experimentos previos (10%, **Tabla 6.2**). Se puede observar que un aumento en el porcentaje de quitosano disminuye la actividad de la enzima (4-6, **Tabla 6.2**). Esto puede deberse a una disminución en el pH de la inmovilización. Esto ha sido verificado experimentalmente, observándose que al aumentar la cantidad de la solución ácida de quitosano, el pH final disminuye, siendo menor a 6 en el caso de los geles preparados con 0.8 % de quitosano.

También se exploró el efecto del pH de la solución amortiguadora empleada durante el proceso de inmovilización, fijando las concentraciones de quitosano en 0.4 % y THEOS en 10 %. Cuando el pH fue elevado de 8 a 8.5, la actividad enzimática relativa aumentó de 0.26 a 0.46 (**Tabla 6.2**, entradas 5 y 7), mientras que a pH 9.0, la actividad relativa disminuyó (**Tabla 6.2**, entrada 8). Consecuentemente, el pH de la solución amortiguadora empleada durante el proceso de inmovilización fue fijado para todos los efectos a 8.5.

Al comparar los valores de actividad de los biocatalizadores obtenidos utilizando TEOS como precursor del sol-gel y PVA como auxiliar polimérico, con respecto a los obtenidos mediante el uso de THEOS y quitosano, se observó que la actividad relativa de los últimos aumentó considerablemente (10 %, en el caso de los materiales basados en TEOS a 50 % en el caso de los basados en THEOS, con respecto a la enzima en solución) posiblemente debido a los efectos perjudiciales descritos para el TEOS con respecto al uso de THEOS. Esto fue confirmado al comparar los valores de actividad relativa de los experimentos realizados en ausencia del auxiliar polimérico (**Tabla 6.1** y **Tabla 6.2**). En el caso de los sistemas inmovilizados obtenidos a partir del precursor TEOS sin agregado del auxiliar polimérico no se observó actividad (**Tabla 6.1**, entrada 1), mientras que en el caso de los obtenidos utilizando THEOS como precursor sin agregado del auxiliar, se observó una actividad relativa de 0.59 (**Tabla 6.2**, entrada 4).

N°	% quitosano	% THEOS	pH Inmov.	Act. Rel. ^a	Rend. %
1	0.8	10	8	0.04	21
2	0.8	20	8	0.02	16
3	0.8	40	8	0.01	10
4	0	10	8	0.59	85
5	0.4	10	8	0.26	73
6	1.3	10	8	0.01	8
7	0.4	10	8.5	0.46	93
8	0.4	10	9.0	0.31	87

^a Act. Rel. = actividad de la enzima inmovilizada /actividad de la enzima en solución. La actividad de la enzima en solución a pH=8, fue de 1130 μ M/min.mg proteína

Tabla 6.2. Efecto del % de THEOS , del % de quitosano y del pH de inmovilización en la actividad y en el rendimiento de la PPM inmovilizada.

Posteriormente, se evaluó la estabilidad operacional de los sistemas inmovilizados, analizando la actividad y el rendimiento de la reacción de síntesis de inosina, a través de los consecutivos usos de los biocatalizadores obtenidos. Se analizó el desempeño del biocatalizador con los re-usos de los sol-geles de quitosano/THEOS/PPM con contenidos de quitosano entre 0-0.6%.

Como se observa en la **Figura 6.3**, los mejores resultados fueron obtenidos en los sistemas inmovilizados con un contenido de quitosano de 0.4 %, mientras que con contenidos de 0.2 % y 0.6%, la actividad disminuyó abruptamente en los primeros usos, perdiéndose completamente en el quinto. En el caso de los sistemas inmovilizados en sílica pura se observó un descenso abrupto de la actividad luego del primer uso, no observándose actividad aparente luego del segundo uso (dato no mostrado). Los sol-geles obtenidos con sílica pura mostraron una menor resistencia mecánica, siendo quebradizos, lo que explicaría la ausencia de estabilidad operacional. Como se observa en la **Figura 6.3**, la actividad desciende abruptamente luego del primer o segundo uso, para mantenerse luego constante con los posteriores usos, en el mejor caso estudiado (0.4%). Esta observación se debe posiblemente a la pérdida de parte de la enzima con los usos, que se hallaba débilmente adsorbida en el soporte.

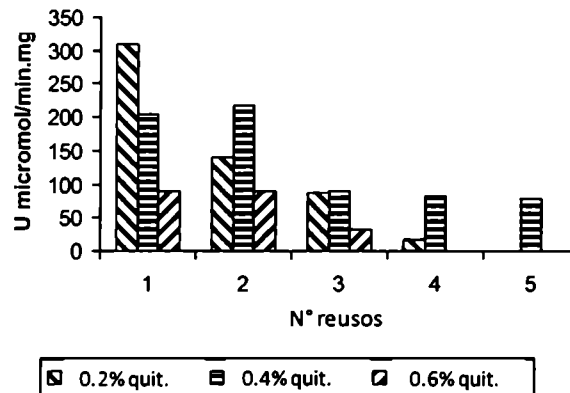


Figura 6.3. Actividad de los sol-gel con diversos contenidos de quitosano en función del número de re-usos.

Con respecto a la estabilidad operacional, también se observó que los sistemas inmovilizados utilizando THEOS como precursor y quitosano como auxiliar polimérico son mejores con respecto a los obtenidos a partir del TEOS y PVA (de pobre estabilidad operacional, **Figura 6.1**). Esto es debido a las ventajas descritas en la primera sección de este apartado.

Los ensayos de estabilidad operacional fueron realizados midiendo la actividad hasta el máximo rendimiento, lavando exhaustivamente los sol-gel luego de cada uso y liofilizando los mismos para extraer de esta forma el agua de hidratación. La resistencia mecánica de los materiales así como la actividad de los mismos puede verse afectada por el proceso de liofilización, por lo que se decidió evaluar el efecto del secado de los sol-gel en la estabilidad operacional (**Figura 6.4**). Los biocatalizadores fueron almacenados, entonces, en solución amortiguadora luego de ser medida su actividad, para su posterior uso. Se observó que los sistemas almacenados de esta manera mostraron mejor estabilidad operacional que los liofilizados. Este efecto puede ser explicado por la desintegración parcial de los soportes generada por la contracción/expansión que acompaña el secado y rehidratación de los mismos con el proceso de liofilización.

Una manera de aumentar la resistencia mecánica de los sol-gel de quitosano/THEOS/PPM es realizar un recubrimiento, por ejemplo con agar. Esto se realizó por inmersión de los mismos una solución 2.5 % de agar a 50°C para rápidamente sumergirlos en aceite de girasol. Aunque la actividad disminuyó en el material recubierto con agar (**Figura 6.4**),

probablemente debido a restricciones difusionales en el caparazón de agar, la disminución de la actividad relativa entre el primer y quinto uso fue menor en comparación con el que no presenta recubrimiento (Figura 6.4).

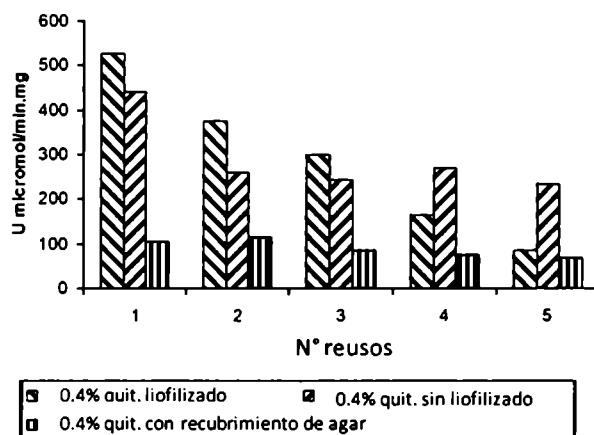


Figura 6.4. Actividad de los sol-geles con 0.4 % de quitosano, con y sin secado y con recubrimiento de agar

6.2.2.3- Co-inmovilización de las enzimas PPM y PNP en sol-geles híbridos de quitosano y sílica

Finalmente, se analizó la co-inmovilización de la PPM y PNP utilizando sol-geles basados en el precursor THEOS con el agregado de 0.4 % de quitosano. La co-inmovilización dio por resultado un biocatalizador activo, sobre el cuál fue evaluada la estabilidad operacional del sistema enzimático inmovilizado, observándose sorprendentemente que el mismo no perdió actividad significativa hasta el sexto re-uso (Figura 6.5A-), lo que es marcadamente diferente de la inmovilización de la PPM, dejando a la enzima PNP en solución.

Cabe destacar que no se observó disminución en el valor de la actividad de los sol-geles en los cuales se ha atrapado simultáneamente la PPM y la PNP, luego del almacenamiento del mismo por dos meses a 4 °C, mostrando una elevada estabilidad en el tiempo, a diferencia de la enzima soluble, en la cual se observó una marcada disminución de la actividad luego del almacenamiento.

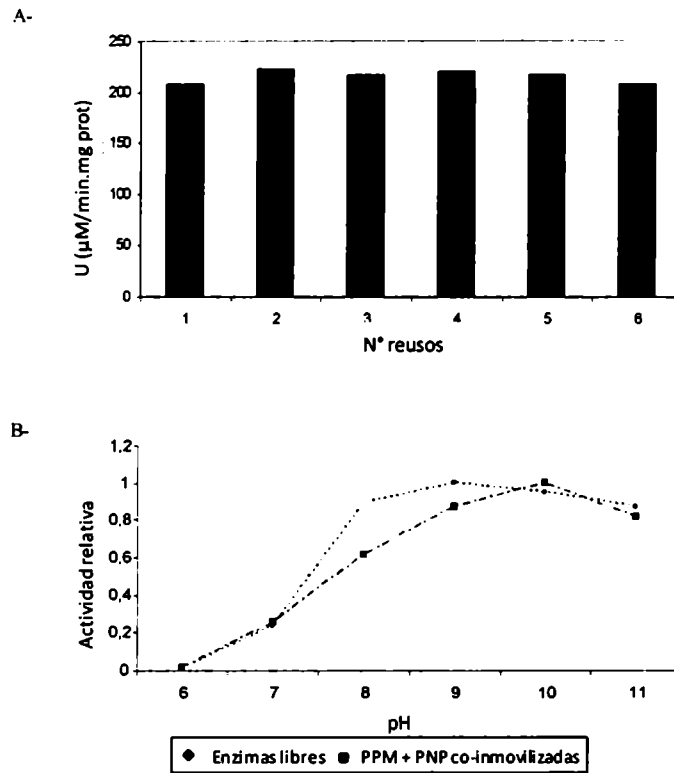


Figura 6.5. A- actividad de los sol-geles de PPM+PNP contra el numero de re-usos. B- perfil de actividad contra pH de las enzimas co-inmovilizadas y de las enzimas libres.

Finalmente, se compararon los perfiles de actividad contra pH de los sol-geles de PPM+PNP y los de las enzimas en solución (Figura 6.5B-). Ambas curvas resultaron ser bastante similares, observándose un desplazamiento del pH óptimo a condiciones más básicas (pH 9 para la enzima en solución y pH 10 para el sistema inmovilizado). Esto concuerda con los reportes obtenidos que muestran que la unión de la enzima a soportes polianiónicos (dado que la sílica se encuentra en mayor proporción que el quitosano) resulta en desplazamientos del pH óptimo a mayores valores.

Debido a estos resultados satisfactorios se decidió evaluar el rendimiento de la síntesis de guanosina con las enzimas co-inmovilizadas. Como se ha descrito en el capítulo 5, la biotransformación de guanina en guanosina se encuentra limitada por la baja solubilidad de la base en agua. Debido al desplazamiento del pH óptimo del sistema inmovilizado a pHs más

básicos, se decidió aumentar el valor de este parámetro en la síntesis de guanosina (a pH=10) para obtener una mayor solubilidad de la base guanina.

El rendimiento de la reacción utilizando el sistema co-inmovilizado de la PPM y PNP, a este nuevo valor de pH, fue del 40% en 2.5 hs. En el capítulo 5 se puede encontrar el valor del rendimiento utilizando las enzimas en solución, siendo éste del 30% en un día de reacción. Por lo que se puede concluir que utilizando el sistema inmovilizado a pH 10, se aumenta el rendimiento de la reacción así como también su cinética.

Con el objetivo de evaluar potenciales aplicaciones de este biocatalizador co-inmovilizado, se decidió evaluar el efecto del aumento de la concentración de sustrato en la actividad y el rendimiento de síntesis. En trabajos con estas enzimas en solución se utilizaron bajas concentraciones de furanosas 5-fosfato debido a la inhibición que produce el fosfato liberado en la reacción de glicosidación. Al trabajar con las enzimas inmovilizadas, se utilizaron mayores concentraciones de sustrato con el agregado equimolar de manganeso, según lo comentado en el capítulo 4 y en todos los casos se trabajó con una concentración final de 30mM de hipoxantina debido a la solubilidad de la misma. Cuando se utilizó una solución 10 mM de ribosa 5-fosfato, se alcanzó un 97% de rendimiento en la reacción de síntesis de inosina en 24 h. Al aumentar la concentración del reactivo a 30 mM, se obtuvo un 65% de rendimiento en 3 h, pero la reacción no continuó avanzando. En este último ensayo se ve que el sustrato y la base se encuentran en condiciones estequiométricas, pudiendo ser este el motivo del menor rendimiento con respecto al primer ensayo mencionado, en el cual la base se encontraba en exceso.

6.3- Conclusiones

Se ensayaron diversas estrategias de inmovilización de la enzima PPM con el objeto de determinar la más adecuada para dicha proteína.

De las estrategias analizadas, se encontró que la más eficiente (mayores valores de rendimiento, actividad y estabilidad operacional) fue el atrapamiento de la misma en materiales híbridos de sílica-biopolímero, preparados mediante la tecnología sol-gel y procesados por la metodología de ISISA. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando como precursor del sol-gel, el THEOS, y como polímero auxiliar, el quitosano.

Luego se co-inmovilizaron exitosamente las enzimas PPM y PNP en el sol-gel híbrido sílica-quitosano. La mejor estabilidad operacional, considerando la actividad contra el número de usos

del biocatalizador inmovilizado, correspondió al sistema co-inmovilizado, en comparación con la enzima PPM inmovilizada. Para la reacción modelo de síntesis de inosina, se alcanzó un alto rendimiento en tiempos cortos, siendo lo más relevante que no se observa pérdida de actividad hasta el séptimo uso del mismo.

Por último se trabajó con mayores concentraciones de sustrato, demostrándose que pueden utilizarse concentraciones de hasta 30 mM con buenos rendimientos a tiempos cortos.

A nuestro leal y saber entender, este el primer reporte de la inmovilización de la PPM.

Capítulo 7

Estudio estructural y funcional de la PPM de *E. coli*

7.1 Objetivos y resumen

Los principales objetivos de este capítulo son la elucidación estructural de la enzima expresada en nuestro laboratorio (PPM de *E. coli*), la determinación del sitio activo de la misma y el modo de unión de los ligandos. Esto se llevó a cabo con el objeto de:

- Comprender el mecanismo biológico fundamental de la PPM y los modos de unión de los ligandos al sitio activo de la enzima.
- Proyectar un diseño racional de mutantes, con el objeto de aumentar la estabilidad de la enzima, ampliar su perfil de pH y la especificidad de los sustratos 5-fosfato. Esto último permitiría la síntesis biocatalizada de nuevos nucleósidos modificados en el azúcar.
- La predicción de las propiedades físico-químicas de la enzima. Esto posibilitará, en un futuro, evaluar la distribución de cargas y los residuos expuestos al solvente, permitiendo una selección más racional de la metodología de inmovilización.

Para la consecución de los objetivos antes mencionados, se precisó predecir el complejo proteína-ligando. Para esto fue necesario llevar a cabo tres pasos: (1) la elucidación de la estructura de la molécula objetivo (PPM), (2) la localización de sitio de unión a ligandos y (3) la determinación del modo de unión. El primer paso fue realizado mediante metodologías de modelado por homología. La localización del sitio de unión a ligandos fue llevado a cabo computacionalmente (por software específicos para dicha tarea), y a su vez, por comparación con las regiones aminoacídicas conservadas en diversos miembros de la familia de las fosfotomutasas y de enzimas relacionadas. El último paso involucró la aplicación de algoritmos de acoplamiento molecular (*docking*) incluidos en el programa Autodock (versión 4.0.).

7.2 Resultados y discusiones

7.2.1 Elucidación estructural de la PPM: Modelado por homología.

El modelado de una proteína por homología es un método que permite predecir la estructura terciaria (3D) de una proteína deseada (*target*) conociendo su secuencia de aminoácidos (estructura primaria) y la estructura terciaria de una homóloga (templado) resuelta por rayos-X o RMN. Este método aprovecha las similitudes de secuencias de aminoácidos y las similitudes estructurales entre proteínas, construyendo una estructura tridimensional para la secuencia incógnita, usando los datos de estructuras tridimensionales conocidas de otras proteínas, cuyas secuencias de aminoácidos guardan similitud con la secuencia incógnita. El modelado por homología se realizó siguiendo la metodología habitual que, en general, consta de cuatro pasos. El primer paso llevado a cabo fue la búsqueda del templado adecuado. El segundo paso fue el alineamiento de las secuencias (*target*-templado). El tercer y cuarto paso fueron el modelado de la proteína y su refinamiento por diversas metodologías respectivamente.

El correcto alineamiento de la secuencia a ser modelada con la de la estructura del templado es el requerimiento más importante en modelado por homología. La identificación de las secuencias homólogas a la de la secuencia de la PPM y el alineamiento múltiple de las mismas se obtuvo por medio del servidor denominado HHpred server (Homology detection & structure prediction by HMM-HMM comparison),¹ aplicando los parámetros por defecto y eligiendo las bases de datos del PDB (Protein Data Bank) y SCOP (Structural Classification of Proteins).

Como material inicial de trabajo se empleó la secuencia aminoacídica de la PPM (407 aa) con número de acceso P0A6K6 en la base de datos UNIPROT (Universal Protein Resource). A partir de dicha secuencia se identificaron las proteínas homólogas con mayores porcentajes de similitud de estructuras resueltas en la base de datos PDB y SCOP mediante una búsqueda utilizando perfiles de modelos ocultos de Markov (profile HMMs)². Este algoritmo de búsqueda se basa en la comparación de secuencias con modelos estadísticos que describen una familia o patrón de secuencias. Asimismo, se ha demostrado que el uso del algoritmo empleado por el servidor HHpred brinda alineamientos de elevada calidad. El alineamiento múltiple obtenido se muestra en la **Figura 7.1**.

¹ Söding, J.; Biegert, A.; Lupas, A.; *Nucleic Acids Research*, 2005, 33; W244

² Söding, J.; *BIOINFORMATICS*, 2004, 21, 951

Cabe remarcar que se observa una elevada similitud entre diversas proteínas en la zona de los aminoácidos 250 a 400 (**Figura 7.1**). Éste es el dominio de unión a metal, que se encuentra altamente conservado en diversas familias de metaloproteínas, como se discutirá más adelante en este capítulo.

De esta forma, se identificó una proteína de la familia de las PPMs en la base de datos PDB (PDB 2i90_A) que comparte un 43 % de identidad con la secuencia de la PPM de *E. coli*, y su estructura de rayos X fue utilizada como estructura templado (resolución de 2 Å).

Se conoce que la precisión de los modelos obtenidos por homología es altamente dependiente del grado de similitud entre las secuencias de la proteína *target* y la correspondiente al templado. Como se observa en la **Figura 7.2**, a mayor porcentaje de similitud entre las secuencias analizadas, menor será el valor de la desviación estándar cuadrática media (RMSD) de la posición de los carbonos α del esqueleto proteico. Usualmente, el modelado de proteínas basado en plantados que comparten un porcentaje de identidad de secuencia mayores al 40 % a la secuencia *target*, genera modelos que poseen la estructura global y el plegamiento proteico correctos³.

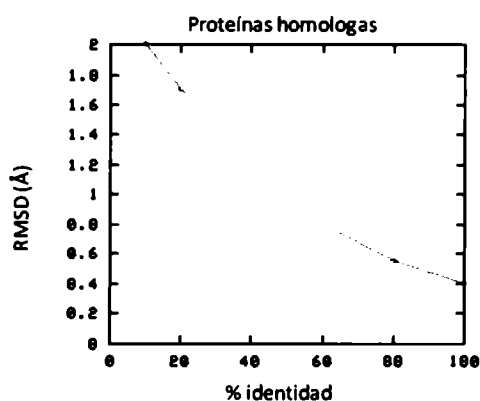
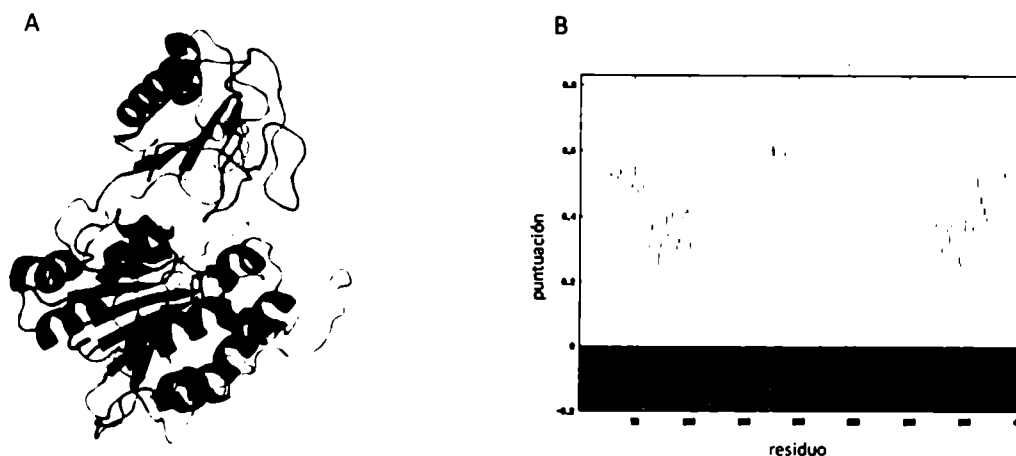


Figura 7.2. Representación de la variación en los valores de RMSD con el porcentaje de similitud entre secuencias.

Una vez obtenido el templado (PDB 2i90_A) alineado correctamente con la secuencia de la PPM, se procedió a la construcción del modelo (tercer paso). Para esto, se utilizó el programa MODELLER (versión 4.0), utilizando el templado seleccionado previamente. El último paso llevado a cabo para la elucidación del modelo de la PPM mediante la metodología de modelado por

³ Kauffman, C.; Rangwala, H.; Karypis, G. *CSB 2008: Stanford University: improving homology models for protein-ligand binding site*, Peter Markstein (Imperial College Press), 2008, ISBN: 1848162634

homología consistió en la evaluación de la calidad del modelo obtenido y su posterior refinamiento. En la **Figura 7.3A**, se muestra la estructura de cinta del modelo obtenido por el programa MODELLER, en la cual se muestra la conformación de la cadena polipeptídica y el patrón de plegamiento global de la cadena.



Con el objeto de evaluar la calidad del modelo de la PPM generado, en primer lugar, se compararon los gráficos de Ramachandran del templatado con el del modelo. Esta comparación mostró que la mayoría de los aminoácidos se encontraron en las conformaciones posibles de las cadenas polipeptídicas (95%), similar al gráfico de Ramachandran del templatado utilizado. Asimismo, como se observa en la **Figura 7.3B**, la representación de la calidad del modelo obtenido por el programa Verify3D confirma que la estructura de la PPM obtenida por el programa MODELLER es un modelo razonable. En esta representación se observa que todos los aminoácidos poseen puntuaciones mayores a 0 (el área rosa remarca las puntuaciones menores a 0, **Figura 7.3B**), indicando una alta compatibilidad secuencia-estructura.

Finalmente se debió realizar el refinamiento del modelo obtenido. Uno de los refinamientos que debió realizarse fue la incorporación de los átomos metálicos (manganeso) al sitio activo de la enzima, debido a que el modelo generado no los incorporaba. Para lo cual se realizó un estudio bibliográfico y secuencial en primera medida, con el objeto de aproximadamente localizar el sitio de unión a metal en dicha proteína.

Galperin et al⁴ han realizado un análisis de la conservación aminoacídica en las secuencias de diversas familias de enzimas. En esta publicación se ha encontrado que las secuencias de las enzimas pertenecientes a la familia de las PPMs muestran similitudes significativas con secuencias de enzimas de la familia de la fosfatasa alcalina (AP) y con otras familias de enzimas, tales como la familia de las sulfatasas, y diversas transferasas e hidrolasas, que actúan sobre sustratos similares (carbohidratos fosfatados). Estas similitudes incluyen una elevada conservación de los residuos del sitio de unión a metal de sus centros activos, y mecanismos catalíticos similares. Estos hallazgos sugieren para los autores, que estas familias de proteínas pertenecerían a una superfamilia de enzimas, denominada la superfamilia de la fosfatasa alcalina.

En el mismo estudio se observó una absoluta conservación de los residuos del sitio de unión a metal en dos familias, la familia de las PPMs y otra familia de enzimas denominada 2,3-bifosfoglicerato mutasas independientes (iPGMs) que catalizan la isomerización de 2- y 3-fosfogliceratos (2-PGA y 3-PGA). Ambas familias de enzimas poseen un requerimiento absoluto de dos iones manganeso para su actividad, a la vez que comparten la misma actividad y poseen una elevada conservación estructural, como se observa en la **Figura 7.4C**. Estas similitudes son de elevada utilidad, debido a que todavía no se dispone de suficiente información de las PPMs a nivel estructural, pero existe una gran cantidad de información estructural y funcional sobre las IPGMs.

Por lo tanto, a fin de completar el modelo de la estructura *target* se precisó incorporar los dos iones metálicos en el sitio de unión a metal. En primer lugar, con el modelo aproximado en mano, se encontraron sin ambigüedad los residuos que formaban parte de dicho sitio en la PPM por comparación entre las secuencias de la PPM y diversos miembros de la familia de la iPGM (los aminoácidos que forman parte del sitio de unión a metal en los miembros de la familia previamente citada, han sido estructuralmente identificados) debido a la absoluta conservación de los mismos. Los aminoácidos que forman parte de este sitio en la enzima PPM son: Asp 8, Asp 345 y His 346, esta tríada de residuos une a uno de los iones manganesos y Asp 304, His 309 y His 357, que coordinan al segundo ión del mismo metal.

⁴Galperin, M.; Bairoch, A.; Koonin, E.; *Protein Science*, 1998, 7, 1829



Figura 7.4. A) Superposición del sitio de unión a metal de la PPM e iPGM antes del refinamiento de la estructura mediante simulaciones de dinámica molecular. B) Superposición del sitio de unión a metal de la PPM e iPGM posterior al refinamiento de la estructura mediante simulaciones de dinámica molecular. C) Superposición estructural de la PPM e iPGM (magenta: PPM, celeste: iPGM).

Luego, se añadieron manualmente ambos manganesos en el entorno de los residuos anteriormente citados, en posiciones similares a las descritas para la proteína iPGM, superponiendo ambos sitios (**Figura 7.4A**). En particular se trabajó con una enzima de la familia de las fosfoglicerato mutasas, que ha sido exitosamente cristalizada (iPGM de *Bacillus Stearothermophilus*, PDB 1o98), su estructura cristalográfica de rayos X de sus complejos con 2-PGA y 3-PGA determinada y que además presenta un elevado porcentaje de similitud entre secuencias con la PPM en estudio. En la **Figura 7.4A** se muestra la superposición del sitio de unión a metal de las dos enzimas (PPM (verde), iPGM (amarillo)), esto ayudó a localizar a los dos iones metálicos aproximadamente en las cercanías de dicho sitio. Una vez aproximadamente ubicados dichos iones, se optimizó la geometría del modelo, en primer lugar utilizando el campo de fuerzas proporcionado por AMBER para luego finalizar la optimización por dinámica molecular.

En la **Figura 7.4B** se muestra la superposición del sitio de unión a metal de las enzimas citadas previamente, posterior al paso de optimización y dinámica molecular, con el objeto de evaluar la factibilidad de dicha optimización. En esta figura se observa la conservación de la estructura global del sitio. Asimismo se calcularon las distancias metal-ligando, para el caso particular del aminoácido histidina, se calcularon las distancias N-Mn, mientras que en el caso del aminoácido aspartato, las distancias O-Mn, obteniéndose valores similares a las distancias promedio calculadas por el servidor MESPEUS (Metal sites in proteins) (**Tabla 7.1**).

	PPM (post dinámica molecular)	Media (MESPEUS)
N-Mn	2.55 Å	2.22 Å
O-Mn	2.21 Å	2.23 Å

Tabla 7.1. Distancias Mn-ligando medias y experimentales.

7.2.2 Localización del sitio de unión.

Un prerequisite para el acoplamiento molecular o *docking* de pequeños ligandos es la determinación del sitio en el cual el ligando interactúa con la proteína. Tales sitios de unión a sustrato generalmente se localizan en cavidades o hendiduras en la superficie de las proteínas. La determinación de estas cavidades es por lo tanto un paso importante en el estudio del modo de unión de la PPM con ligandos.

Para esta determinación se explotaron las similitudes, tanto estructurales como funcionales, entre las proteínas de la familia de las PPMs y las iPGMs. En particular, como se citó previamente, se estudió la enzima iPGM de *Bacillus Stearothermophilus* debido a su elevado porcentaje de similitud y, también, a que ha sido resuelta su estructura por difracción de rayos X. La estructura de esta enzima se compone de dos dominios, denominados fosfotransferasa y fosfatasa, a cuenta de sus respectivos roles en la catálisis (ambos dominios poseen una topología α/β , así como los dominios correspondientes de la PPM). Los residuos del sitio de unión a ambos sustratos (2-PGA y 3-PGA) y a ambos iones manganesos están localizados en una hendidura situada entre los dominios. La localización del sitio activo en una interfase entre dominios es característica de muchas enzimas. El grupo fosfato del sustrato, así como los dos iones manganeso interactúan principalmente con el dominio fosfatasa, que contiene un residuo esencial para la

actividad enzimática, Ser 62, mientras que el carbohidrato del PGA interactúa sólo con el dominio transferasa. En reportes anteriores⁵, se realizó una comparación estructural de las iPGMs con la superfamilia de la fosfatasa alcalina mostrándose que estas enzimas poseen una estructura básica común y una localización similar del residuo esencial conservado en todos los miembros de la superfamilia, pudiendo ser tanto Ser, Cys como Thr y dos iones divalentes (que pueden ser además de manganeso, níquel, cobalto, etc.) en sus sitios activos.

Se demostró en el mismo estudio, que este residuo era esencial para la actividad. Con este objetivo se sobreexpresó y cristalizó una enzima mutante (S62A), en la cual se intercambié el residuo serínico 62 por alanina. Esta mutante no mostró actividad mutasa. Asimismo, se demostró que la enzima mutada perdía la capacidad de unir a uno de los iones manganeso, comprobándose de esta forma, que los residuos del sitio de unión a metal, eran insuficientes para la unión del metal al centro activo.

El mecanismo catalítico propuesto para esta enzima involucra la formación de un intermediario fosforilado (E-P). El ion manganeso juega un rol esencial en el mecanismo, a través de la coordinación de tanto el sustrato como el producto de la reacción, así como, del intermediario fosfoserínico. Se ha propuesto que el dominio fosfatasa es responsable de la actividad fosfatasa de la reacción catalítica mientras que el dominio transferasa contribuye a la reorientación del glicerato del los PGA (2- y 3-) y es el responsable de la transferencia del grupo fosfato al glicerato reorientado⁶.

En la **Figura 7.4C** se muestra la superposición estructural de las dos enzimas previamente citadas (PPM y iPGM). Asimismo, se realizó la superposición de las estructuras de diversas PPMs e iPGMs, utilizando el servidor denominado DALI (datos no mostrado) observándose que todos los miembros de las familias analizadas contienen dos dominios distintivos, formando una hendidura entre ambos, sugiriendo este hecho la misma localización del sitio activo. Se vio que en todas las proteínas estudiadas, la orientación de ambos dominios era la misma. A su vez, como se citó previamente, los seis residuos involucrados en el sitio de unión a metal se encuentran completamente conservados.

Con lo mencionado anteriormente, se puede concluir que la información mecanística y estructural de las iPGMs es relevante para la investigación funcional y estructural de la PPM en cuestión. Considerando la información estructural de la iPGM, se puede proponer que la enzima

⁵Rigden, D.; Lamani, E.; Mello, L.; Littlejohn, J.; Jedrzejas, M.; *J. Mol. Biol.*, **2003**, 328, 909

⁶Chander, M.; Setlow, P.; Lamani, E.; Jedrzejas, M.; *Journal of Structural Biology*, **1999**, 126, 156

PPM posee también estos dos dominios, el dominio fosfatasa (conservado en todos los miembros de la superfamilia de la fosfatasa alcalina) y el dominio transferasa (sólo presente en estas dos familias de enzimas), que uniría a la ribosa y desoxirribosa; y a su vez que el sitio activo de la enzima estaría localizado en la hendidura entre ellos, así como se describió para las iPGMs.

Con el objeto de confirmar estas suposiciones, se ha estudiado a la vez el sitio de unión a sustratos utilizando un *software* denominado LIGSITE⁷. Éste es un programa desarrollado para la detección automática y eficiente de hendiduras en la superficie de las proteínas, las cuales podrían actuar como sitios de unión para pequeños moléculas de ligando. Utiliza el algoritmo de Levitt y Baznack⁷, generando grillas cartesianas y calculando la accesibilidad a solvente en cada punto de la grilla. Como se muestra en la **Figura 7.5A**, la hendidura calculada se encuentra localizada en la cavidad situada entre ambos dominios, como se supuso previamente por comparación estructural y funcional entre las proteínas PPM e iPGM.

Por último, se estudió también la conservación aminoacídica entre las secuencias de varios miembros de la familia de la PPM. Se escogieron para este estudio de alineamiento de secuencias, las PPMs de 88 orígenes bacterianos diversos con una redundancia secuencial menor al 90 % y de similar peso molecular. En la **Figura 7.5B** se muestra la localización de los residuos total y fuertemente conservados cercanos al sitio activo propuesto (se excluyeron, para este estudio, los residuos conservados lejanos a la hendidura entre dominios). Se concluyó que esta cavidad se encuentra altamente conservada entre los miembros de la familia de las PPMs, confirmando la hipótesis planteada en este capítulo, acerca de la localización del sitio activo de la PPM en la hendidura entre los dominios fosfatasa y fosfotransferasa.

⁷ Hendlich, M.; Rippmann, F.; Barnickel, G.; *Journal of Molecular Graphics and Modelling* , 1997, 15, 359

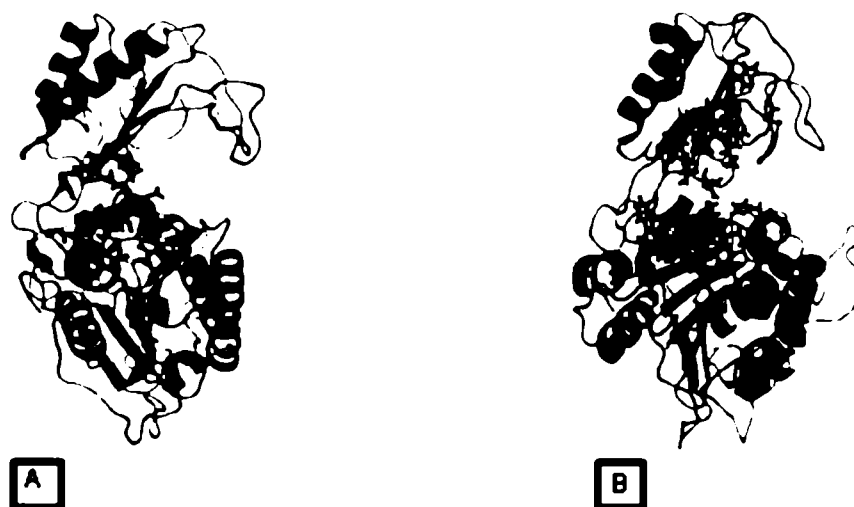


Figura 7.5. A) Modelo de cintas de la PPM, en el cual se resalta en rojo el sitio de unión a sustrato obtenido por el servidor LIGSITE. B) Modelo de cintas en el cual se resaltan los residuos conservados próximos al sitio de unión propuesto, obtenido por alineamiento de secuencias de 88 PPMs.

Como se describió previamente en este capítulo, el estudio realizado por Schein et al⁸ basado en el alineamiento de secuencias de diversos miembros de la superfamilia de la fosfatasa alcalina utilizando PSI-BLAST, permitió hallar los residuos conservados del sitio de unión a metal en todos los miembros de la superfamilia, así como la localización de los residuos Ser, Cys o Thr, esenciales para la unión del fosfato a la enzima. De acuerdo a esta publicación no se pudo identificar, en el caso de la PPM, este residuo sin ambigüedad, pero fue tentativamente predicho a partir del alineamiento de las estructuras secundarias como el residuo Thr 28. Con el modelo de la PPM en mano, se intentó confirmar dicha predicción. Como se muestra en la **Figura 7.6**, por comparación entre la estructura de la PPM (modelo) con la correspondiente de la IPGM de *Bacillus Stearothermophilus*, el residuo propuesto se encuentra lejos del sitio de unión a metal. En lugar de este residuo, se propone la Thr 96 como residuo esencial para la unión del fosfato (**Figura 7.6B**). Esta asunción será verificada experimentalmente en trabajos futuros, sobreexpresando una mutante (generada por mutagénesis dirigida) en la cuál dicho residuo sea eliminado o intercambiado.

⁸ Chen, D.; Menche, G.; Power, T.; Sower, L.; Peterson, J.; Schein, C.; *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 2001, 45, 318

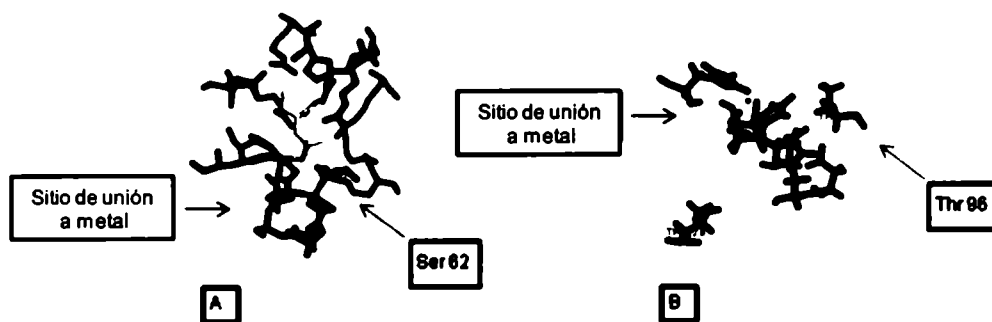


Figura 7.6. A) Sitio activo de la IPGM. B) Sitio activo parcial de la PPM (Azul: sitio de unión a metal, rosa: otros residuos del sitio activo, rojo: residuo esencial para la unión a fosfato, amarillo: sustrato)

7.2.3 Determinación del modo de unión.

La determinación del modo de unión de ligandos dentro de la estructura de la PPM, que podría llevar al diseño de nuevos sustratos para la reacción transferasa, es desafiante por dos motivos. El primero es el uso de un modelo generado por la metodología citada en la primera sección, esto es, por modelado por homología para el experimento de acoplamiento molecular o *docking*. Los modelos así generados, en general, presentan menores precisiones que los obtenidos a través de determinaciones estructurales por rayos X o RMN. El segundo refiere a las dificultades inherentes al *docking* de pequeños ligandos en estructuras de metaloproteínas.

En el primer caso, se han publicado un gran número de estudios del uso de modelos de proteínas generados por la metodología de modelado por homología para realizar experimentos de *docking*⁹. Estos estudios muestran que la performance de los cálculos de *docking* es altamente dependiente de la representación de la proteína. Los modelos obtenidos por modelado por homología con similitudes de secuencias entre 30% y 50% son considerados de moderada precisión. Estos modelos pueden ser utilizados directamente para los experimentos de *docking* de pequeñas moléculas si son construidos y refinados mediante simulaciones de dinámica molecular, o si se considera, en los experimentos, la flexibilidad de la proteína¹⁰. Para la consecución de los objetivos planteados, se consideró que el modelo refinado por dinámica molecular obtenido en la

⁹ a) Thorsøe, K.; Bak, S.; Olsen, C.; Imberty, A.; Breton, C.; Møller, B.; *Plant Physiol.*, **2005**, 139, 664 ,b) Iorga, B.; Herlem, D.; Barré, E.; Guillou, C.; *J. Mol. Model.*, **2006**, 12, 366 ,c) Radestock, S.; Weil, T.; Renner, S.; *J. Chem. Inf. Model.*, **2008**, 48, 1104 ,d) Schafferhans, A.; Klebe, G.; *J. Mol. Biol.*, **2001**, 307, 407

¹⁰ Krovat, E.; Steindl, T.; Langer, T.; *Current Computer-Aided Drug Design*, **2005**, 1, 93

primera sección de este capítulo es lo suficientemente preciso para la determinación aproximada del modo de unión de ligandos a la PPM.

En el segundo caso, el *docking* de moléculas en sitios activos que contengan uno o más metales es muy desafiante, como se ha mencionado anteriormente, debido a las múltiples geometrías posibles de coordinación y asimismo debido a la falta de parámetros de campos de fuerza suficientemente precisos para las interacciones ligando-metal. Además, no es directa la inclusión o no de moléculas de agua en el sitio activo de la enzima. Ciertas moléculas de agua discretas pueden mediar la unión del ligando a la enzima, o pueden directamente participar como una molécula de co-sustrato en la catálisis junto con los metales. Se decidió en primera instancia explorar el modo de unión removiendo todas las moléculas de agua de la estructura de la PPM optimizada, como recomiendan muchos manuales de *docking*¹¹. Con respecto al tratamiento de la coordinación del metal, se sabe que los programas actuales que realizan experimentos de *docking* son deficientes en este particular caso. En estudios anteriores¹² se ha comparado la performance de diversos programas de *docking*, mediante experimentos de acoplamiento molecular de sustratos llevados a cabo sobre sitios activos de metaloproteínas. El resultado de estos estudios mostró que el programa denominado AUTODOCK era el más confiable para este tipo de experimentos. A la vez, el programa AUTODOCK es uno de las herramientas de *docking* accesibles más fiables en la actualidad, siendo esta eficiencia debida al uso de un algoritmo genético y a funciones de puntuación (*scoring*) que incluyen diversos parámetros (energías de dispersión/repulsión, carácter direccional de los puentes de hidrógeno, potenciales electrostáticos coulómicos basados en el campo de fuerzas AMBER, un término de solvatación basado en volumen, y una suma ponderada de los grados de libertad torsionales para estimar el costo entrópico de la unión). Estos parámetros así como la posibilidad de utilizar tanto torsiones flexibles como rígidas para los ligandos durante el procedimiento llevado a cabo con el programa AUTODOCK, hacen de éste una herramienta apropiada para el propósito de este capítulo¹³.

¹¹ Pospisil, P.; Folkers, G.; *FABAD J. Pharm. Sci.*, **2004**, *29*, 81

¹² Chen, D.; Menche, G.; Power, T.; Sower, L.; Peterson, J.; Schein, C.; *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, **2007**, *67*, 593

¹³ Cornell, W.; Cieplak, P.; Bayly, C.; Gould, I.; Merz, K.; Ferguson, D.; Spellmeyer, D.; Fox, T.; Caldwell, J.; Kollman, P.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5179

7.2.3.1. Estudios preliminares en sistemas conocidos. Evaluación de la carga del metal y de la eficiencia de los experimentos de *docking* en metaloproteínas utilizando el programa AUTODOCK.

Se conoce que alterar la carga de los iones metálicos afecta en gran medida las puntuaciones (*scores*) globales de los experimentos de *docking* realizados utilizando el programa AUTODOCK⁹. Con el objeto de investigar el efecto de la carga de los iones manganeso en la precisión del experimento de acoplamiento molecular, se evaluó en primer lugar el *docking* del sustrato 2-PGA en el sitio activo de la iPGM variando la carga del metal. Se utilizó para este ensayo la estructura cristalina del complejo proteína-ligando (iPGM-2-PGA) que fue obtenido de la base de datos PDB (PDB 1o98). El experimento de *docking* del 2-PGA en el sitio activo de la iPGM fue realizado con el programa AUTODOCK (version 4.0).

Se utilizó la interfaz gráfica, AUTODOCKTOOLS¹⁴ para añadir hidrógenos polares y cargas parciales a la proteína y al ligando. Los parámetros diversos para el éxito del experimento de *docking* se fijaron con las herramientas ADDSOL y AUTOTORS y se describen, así como las condiciones experimentales empleadas para el ensayo, en la sección de materiales y métodos. La carga del manganeso fue añadida manualmente directamente sobre los archivos pdbq generados por estas herramientas. Se realizaron dos ensayos variando la carga del manganeso de +1 a +2. Una vez generada la grilla de afinidad utilizando el programa auxiliar AUTOGRID, se realizó el experimento de *docking* utilizando el algoritmo genético híbrido de búsqueda local (GA-LS). Las conformaciones resultantes del experimento de *docking* fueron agrupadas en *clusters* o familias con modos de unión similar, con una tolerancia entre grupos de la desviación cuadrática media (RMSD) de 2 Å. La eficiencia del experimento fue medida basada en la RMSD de los sustratos obtenidos por el experimento de *docking* relativos al obtenido experimentalmente.

¹⁴ Sanner, M.; Duncan, B.; Carrillo, C.; Olson, A.; *Pac. Symp. Biocomput.*, 1999, 401

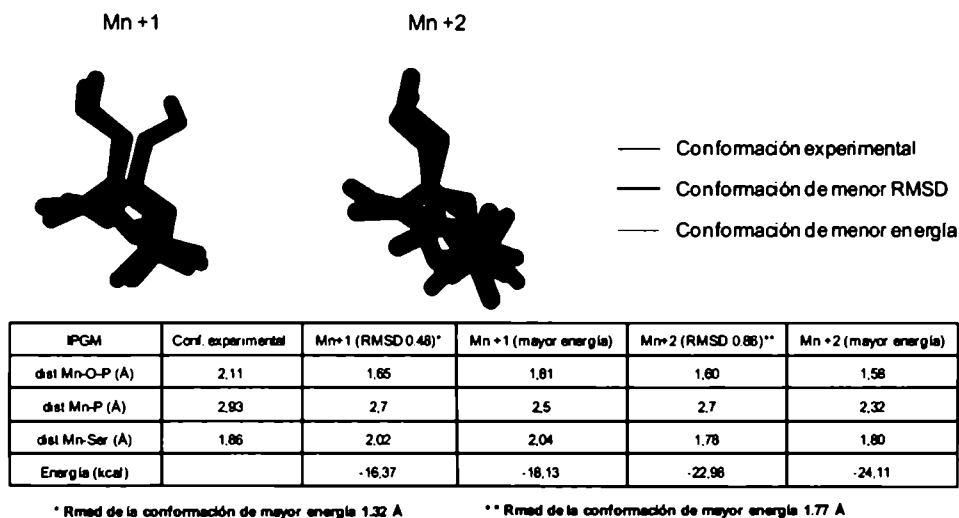


Figura 7.7. Efecto de la carga del ión manganeso en la precisión del experimento de docking.

Asimismo se analizaron las distancias Mn-O-P y Mn-Ser62 (Figura 7.7). En la Tabla 7.2, se muestran los resultados de un reporte publicado por otros autores, en el cual se calculó el promedio de las distancias entre el metal y el grupo fosfato del ligando (Mn-O y Mn-P) en metaloproteínas¹⁵. En este estudio se caracterizó la geometría de la unión proteína-metal-fosfato utilizando información estructural derivada de todas las estructuras depositadas en la base de datos del Protein Data Bank. Se seleccionaron para este ensayo, las estructuras con una resolución de 2.8 Å o mejor, para validar los resultados obtenidos en los experimentos de *docking*.

Distancia media Mn - O _{fosfato} (Å)	1.90
Distancia media Mn - P _{fosfato} (Å)	3.34

Tabla 7.2. Distancia media entre los iones manganeso y el grupo fosfato en metaloproteínas.

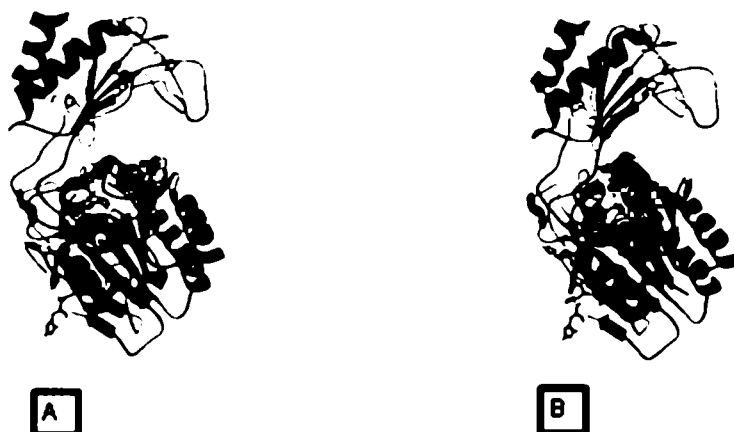
Como se observa en la Figura 7.7, basados en los valores de RMSD, la conformación del ligando que brindó el mejor resultado (el de menor RMSD), se encontró próxima a la posición determinada experimentalmente en la estructura cristalina del co-cristal 2-PGA-IPGM, en ambos casos estudiados, o sea, con el manganeso de carga +1 y +2. Sin embargo, la conformación de mayor energía en módulo (*best docked energy*) no coincidió con la conformación de menor RMSD (los valores de RMSD de las conformaciones de mayor energía en módulo se indican al pie de cuadro). No obstante las dos conformaciones en ambos casos, no difieren significativamente y

¹⁵ Harding, M; *Acta Cryst.*, 2006, D62, 678

ambas cumplen con el criterio de "éxito" descrito en literatura¹⁵, que indica una diferencia ≤ 2.4 Å de RMSD entre las conformaciones obtenidas por el experimento de *docking* y las determinadas experimentalmente. Los valores obtenidos en los experimentos de *docking* variando la carga del metal, no difieren significativamente, por lo que no se pudieron utilizar como parámetro para la selección de la carga óptima del metal para realizar estos ensayos. A pesar del éxito logrado en la localización aproximada del sustrato en el sitio activo de la iPGM, el programa AUTODOCK posicionó al grupo fosfato más cercano que lo esperado al ión manganeso. En la tabla de la Figura 7.7, se muestran las distancias manganeso-fosfato, calculadas a partir de las conformaciones obtenidas por los experimentos de *docking* realizados, así como las calculadas a partir de la estructura del co-cristal determinada experimentalmente por rayos X. Las distancias Mn-O y Mn-O-P calculadas a partir de las mejores conformaciones obtenidas por los experimentos de acoplamiento molecular son menores a las medias así como menores a las experimentales, indicando estos resultados, una sobreestimación de la interacción entre el manganeso y el grupo fosfato. Estas observaciones serán discutidas en la siguiente sección de este capítulo.

7.2.3.2. Experimentos de *docking* - selección de las condiciones experimentales

Luego, se exploraron diversas condiciones experimentales en el análisis de *docking*, utilizando como ligando ribosa 5-fosfato y el modelo de la PPM generado en las secciones anteriores. El primer parámetro analizado fue la carga en el ión manganeso. Como se ha citado en la sección de materiales y métodos el archivo PDB del ligando fue extraído de la base de datos depositada en el RCSB PROTEIN DATA BANK y se optimizó tanto su geometría como su carga utilizando el servidor Dundee PRODRG2. Con el objeto de confirmar la localización del sitio activo propuesto de la PPM, se realizó un experimento denominado *blind docking* (como se indica en materiales y métodos). Este ensayo implicó realizar el procedimiento de *docking* a toda la proteína sin imposición de un sitio específico de unión. Se seleccionaron las cargas del manganeso +1 y +2 nuevamente. Como se observa en la Figura 7.8A, en ambos experimentos el sustrato fue situado lejos del sitio activo propuesto. En los dos experimentos realizados, el fosfato no presentó uniones de puente de hidrógeno con el residuo Thr 96, aminoácido propuesto como esencial para la unión del grupo fosfato y, asimismo, no presentó interacción alguna con los iones manganeso.



Carga Mn	Mn +7	Mn +5	Mn +3	Mn +2	Mn +1
dist Mn-O-P (Å)	1.5	1.484	1.57	-	-
dist Mn-P (Å)	2.49	2.48	2.57	-	-
dist Mn-Thr (Å)	1.83	1.65	1.78	-	-
Energía (kcal)	-31.53	-17.56	-9.43	-4.24	-4.72

Figura 7.8. A) Docking de la ribosa 5-fosfato en la PPM fijando la carga del Mn⁺¹ B) Docking de la ribosa 5-fosfato en la PPM fijando la carga del Mn⁺³. Tabla) efecto de la carga del manganeso en los experimentos "blind docking" de la ribosa 5-fosfato en el modelo de la PPM.

Por esta razón se decidió realizar nuevos experimentos de acoplamiento molecular, fijando la carga del ión manganeso en valores más elevados (+3, +5 y +7). En estos ensayos se observó que el ligando efectivamente se situó en el sitio activo esperado. Asimismo, se observó que el grupo fosfato se ubicó cerca de los iones manganesos, formando uniones puentes de hidrógeno con el residuo Thr 96 (Figura 7.8B).

Luego se realizó un experimento de acoplamiento molecular imponiendo el sitio activo propuesto de la enzima, como se indica en materiales y métodos, fijando para dicho experimento, la carga del manganeso como se llevó a cabo en el estudio de *blind docking* (+1, +2, +3, +5 y +7). Se observó en estos casos (exceptuando cuando se fijó la carga del manganeso en +1), que las mejores conformaciones obtenidas (*best docked energy*) mediante estos experimentos, formaron uniones puente de hidrógeno con el residuo Thr 96, y se situaron cerca de uno de los iones manganeso. Asimismo se obtuvieron mayores valores absolutos de energía de interacción que los obtenidos para el experimento realizado sin fijar el sitio activo de la enzima. Esto se debe a que una mejora en la resolución de la grilla de afinidad permite una mejor evaluación de las

interacciones ligando-proteína y en consecuencia aumenta el valor absoluto de la energía de interacción con respecto al ensayo "a ciegas". Sin embargo, cuando el experimento se llevó a cabo fijando la carga del metal en +1, sólo algunas conformaciones se situaron en las proximidades del sitio activo propuesto, observándose la conformación de mayor energía (en módulo) lejos del mismo.

Por este motivo se seleccionaron, para los experimentos de *docking*, las condiciones con el centro de la grilla localizado próximo al sitio activo propuesto de la PPM y fijando la carga del ión manganeso en +2, como se indica en la mayoría de las publicaciones que describen el acoplamiento molecular de sustratos a metaloproteínas que contienen cationes divalentes.

En todos los casos estudiados, se observó la sobreestimación de la interacción fosfato-manganeso, mostrando distancias menores que las esperadas entre el metal divalente y el grupo fosfato. Con estos resultados se puede concluir que el programa Autodock reconoce el sitio de unión a manganeso en todas las simulaciones llevadas a cabo (excepto para el caso del Mn +1). Sin embargo parece ser que *doquea* consistentemente a las conformaciones más cerca de los iones manganeso que lo esperado. Esto se puede atribuir a errores en la función de puntuación energética utilizada por el programa, lo cual no es sorprendente considerando la falta de precisión en los parámetros del metal. De hecho, ha sido reportado el mismo problema en simulaciones de acoplamiento molecular de diversos ligandos a metaloproteínas que contienen zinc en su sitio activo. En estos reportes se han mejorado los resultados obtenidos mediante la variación de la carga formal en los átomos metálicos, metodología también aplicada en este trabajo.

AUTODOCK utiliza el método de Gasteiger-Marsili para el cálculo de las cargas atómicas, el mismo calcula las electronegatividades basadas en el grado de ocupación y valencia de los orbitales interaccionantes. Como resultado, las cargas de los metales sólo pueden asignarse con exactitud teniendo en cuenta las cargas en todos los átomos vecinos y por lo tanto, cualquier variación manual en la carga atómica debe ser reflejada en las cargas de los átomos circundantes. Como esto no puede ser realizado adecuadamente con el programa actual, la adopción de cargas formales como primera aproximación es probablemente la opción más segura hasta que se publique una nueva versión del AUTODOCK más eficiente.

7.2.3.3.- Experimentos de *docking* evaluando como ligando las furanosas 5-fosfato.

Una vez seleccionado el sitio de unión del ligando para los experimentos de *docking* (centro de la grilla de afinidad) y la carga del metal, se realizaron experimentos de acoplamiento molecular con los sustratos conocidos de la PPM (desoxirribosa 5-fosfato, ribosa 5-fosfato y arabinosa 5-fosfato). Como no se conoce la preferencia diastereomérica de los ligandos unidos a la estructura de la PPM, se precisó realizar experimentos de *docking* tanto para los anómeros de las furanosas α como para los β , así como para las formas acíclicas de los tres azúcares fosfato. Se observó en todos los casos, que los sustratos se localizaron en el sitio de unión propuesto anteriormente, formándose uniones puente de hidrógeno entre el fosfato y el residuo Thr 96. Asimismo el grupo fosfato se halló a la distancia esperada del ión manganeso. Sin embargo, se observaron diversas orientaciones del resto sacárido de los ligandos, agrupadas las mismas en *clusters* o grupos de conformaciones (RMSD < 2Å). Se halló que los residuos comúnmente involucrados en la interacción de los azúcares fosfato con el sitio activo de la proteína fueron Asp 171, Lys 257, His 346, Thr 96, Ser 304, Ser 305. Estos residuos se encontraron entre los residuos conservados dentro de la familia de las PPMs. Sin embargo, no se pudo observar un patrón de selectividad único entre los ligandos citados previamente, por comparación de las energías de interacción brindadas por el programa de *docking*, probablemente debido a que la energía de unión entre el grupo fosfato y el manganeso (de gran magnitud) enmascara pequeñas variaciones en la energía debido a las interacciones entre el resto carbohidrato del ligando y la proteína. En los tres casos estudiados la mejor energía de unión calculada por el algoritmo del programa de *docking* fue obtenida para el anómero β .

7.2.3.4. Experimentos de *docking* evaluando como ligando las α -D-furanosas 1-fosfato.

Debido a la complejidad estructural de los ligandos (diversos epímeros) y la falta de información acerca de la actividad de la PPM utilizando como sustratos azúcares 5-fosfatos, se decidió realizar experimentos de acoplamiento molecular ensayando como sustratos las furanosas 1-fosfato. Se conoce que el anómero α es el sustrato para la reacción de transferencia del fosfato, y asimismo hay varias publicaciones donde se evaluó la actividad de la PPM para varios azúcares 1-fosfato. El procedimiento para llevar a cabo los experimentos de *docking* fue el mismo que el citado previamente, evaluando en este caso la α -D-ribosa 1-fosfato (α -R-1-P), la α -D-desoxirribosa

1-fosfato (α -dR-1-P) y la α -D-arabinosa 1-fosfato (α -A-1-P). Se utilizaron los parámetros por defecto, excepto por el número de generaciones, evaluaciones de energía y corridas de *docking* (esto es el número de conformaciones que el programa registra) que se fijaron en 100 en todos los casos (a diferencia de 10 que fue el número de conformaciones obtenidas en los casos descritos anteriormente). El aumento en el número de corridas de *docking* fue realizado con el objeto de llevar a cabo un análisis estadístico más preciso, aunque este aumento afecte en gran medida el tiempo de análisis (10 horas (100 corridas) contra 30 minutos (10 corridas)).

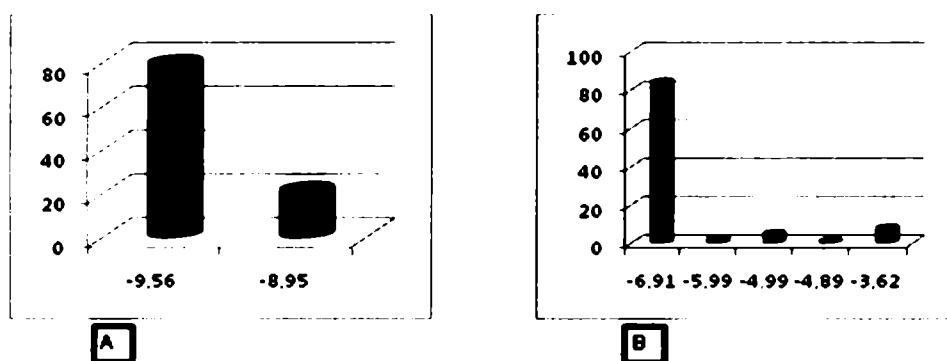


Figura 7.9. A) Representación gráfica de los *clusters* obtenidos en el *docking* de α -D-desoxirribosa 1-fosfato en la estructura de la PPM. B) Representación gráfica de los *clusters* obtenidos en el *docking* de α -D-ribosa 1-fosfato en la estructura de la PPM. (Eje X: Energías de interacción (docked energies). Eje Y: Número de conformaciones).

Las 100 conformaciones resultantes de los tres ligandos analizados fueron agrupadas según el criterio descrito anteriormente, y se observó que las mismas se localizaron en el sitio activo propuesto. En el caso de la α -R-1-P y α -dR-1-P, se observó un grupo o *cluster* mayoritario con una población de aproximadamente el 80 % de las conformaciones (con las mejores energías de interacción, **Figura 7.9**). Mientras que en el caso de la α -A-1-P, no se observó un grupo mayoritario, en cambio se observó una elevada dispersión de grupos o *clusters*, por este motivo los resultados obtenidos para este ligando no pudieron ser utilizados en el análisis del modo de unión a la PPM.

Luego, al analizar los *clusters* mayoritarios en ambos azúcares (α -R-1P y α -dR-1-P), se encontraron dos posibles modos de unión con un RMSD de aproximadamente 1.3 Å. los criterios de selección de modo de unión fueron los siguientes:

- La similitud espacial de las diversas soluciones generadas para los diversos ligandos

- La mayor proporción de interacciones entre el ligando y la proteína.
- La conservación de los residuos involucrados en el modo de unión dentro de la familia de las PPMs.
- El número de confórmers en cada modo.

Los modos de unión fueron definidos superponiendo todas las conformaciones de los dos ligandos estudiados y comparando los residuos involucrados en la interacción ligando-proteína.

El primer modo de unión propuesto se muestra en la **Figura 7.10A**. En el caso de la α R-1-P se halló que el grupo fosfato interactuaba con el residuo Thr 96 y con la Lys 257. El azúcar del sustrato α R-1-P mostró interacciones puente de hidrógeno entre el grupo OH-5 y el residuo Ser 304, entre el grupo OH-2 y los residuos Lys 257 y Asp 171 y finalmente entre el grupo OH-3 y el residuo Asp 171. Este patrón de unión se repite en el caso del sustrato α D-1-P, donde se encontraron las mismas interacciones salvo pequeñas excepciones. En este caso el grupo fosfato además de interactuar con los dos residuos anteriormente citados (Thr 96 y Lys 257) lo hace también con el residuo His 346. Los OH-5 y OH-3 mostraron puentes de hidrógeno con los residuos Ser 304 y Asp 171 respectivamente, así como en la α R-1-P. En ambos casos, la predicción de este modo de unión se halló entre las mejores energías de *docking*.

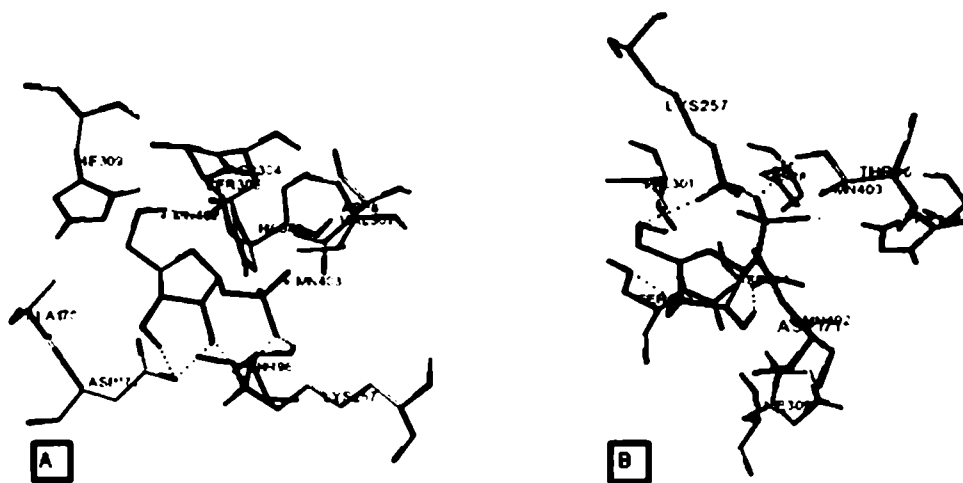


Figura 7.10. Modos de unión representativos de la α -D-ribosa 1-fosfato con la PPM. A) Primer modo de unión propuesto. B) Segundo modo de unión propuesto.

En el segundo modo de unión propuesto, el grupo fosfato en ambos azúcares se comporta como en el primer modo, como puede observarse en la **Figura 7.10B**. La diferencia entre estos dos modos de unión radica en la orientación del esqueleto furanósico. En el caso de la α R-1-P, los OH-5, OH-3 y OH-2 se unen por interacciones puente de hidrógeno con los residuos Lys 257, Ser 305 y Ser 304 respectivamente. En el caso de las α R-1-P, se repite el patrón de interacción, observándose también la unión por interacciones puente de hidrógeno entre el OH-3 y el residuo Asp 171.

Cabe destacar que los residuos involucrados en las interacciones entre las furanosas 1-fosfato y la PPM son los mismos que los hallados anteriormente para la interacción de las furanosas 5-fosfato y esta enzima.

Los resultados obtenidos muestran posibles modos de unión de ligandos al sitio activo de la PPM de manera aproximada. Esta incertidumbre se encuentra relacionada al hecho de que se ha utilizado un modelo generado por modelado por homología para el proceso de *docking* (con su incerteza asociada), a que no se ha podido seleccionar una carga del ión manganeso óptima, y finalmente a que no se ha considerado la flexibilidad de la proteína. Este último factor puede influenciar los modos de unión de los ligandos y entonces las afinidades y orientaciones pueden verse modificadas. Adicionalmente, cabe destacar que estos modos de unión fueron hallados en ausencia de moléculas de agua. Debido a estas incertidumbres se hace necesario verificar experimentalmente estas predicciones. Pero, para el propósito de obtener un modelo preliminar para la determinación de los aminoácidos claves involucrados en las interacciones ligando-proteína, se considera que es una aproximación suficientemente precisa, y nos guiará en un futuro para el diseño racional de mutantes con el objeto de aumentar su estabilidad (temperatura y pH) y de relajar la especificidad por los azúcares fosfato.

7.2.4 Una explicación experimental

Con esta propuesta del modelo de la PPM, se evaluaron los resultados relacionados con la imposibilidad de hidrolizar la cola de polihistidinas en la enzima PPM sobreexpresada. Esta cola de polihistidinas había sido añadida en el sistema de expresión con el objeto de facilitar la purificación de la enzima recombinante. De esta manera, la enzima puede ser fácilmente purificada utilizando cromatografía de afinidad usando columnas de Ni-agarosa. Luego del paso de purificación y debido a la baja actividad de la PPM, se intentó remover estos residuos de histidina

añadidos, utilizando una hidrolasa específica denominada enteroquinasa. Se intentaron diversas condiciones para enzimáticamente remover esta cola de polihistidinas, sin éxito. Como se observa en la **Figura 7.11**, la cola de polihistidinas se encuentra ubicada dentro de uno de los dominios de la PPM modelada (los residuos del extremo *N*-terminal de la proteína se han resaltado en rosa). La incapacidad de hidrolizar enzimáticamente la cola de polihistidinas puede ser explicado debido a que la misma se halla enterrada dentro del dominio, siendo de esta forma inaccesible al ataque por la enteroquinasa.



Figura 7.11. Localización de los residuos *N*-terminales en la cadena de la PPM.

7.3 Conclusiones

En el presente capítulo se ha generado el modelo de la PPM de *E. coli* por la metodología de modelado por homología. Luego se ha hallado el sitio de unión a ligandos por diversos medios. Finalmente se ha determinado el modo de unión por experimentos de acoplamiento molecular o *docking*. Estos experimentos revelan dos posibles modos de unión para los ligandos estudiados, en los cuales intervienen los mismos residuos.

Se precisará de futuras investigaciones para establecer el modo de unión de esta enzima.



Capítulo 8

Resumen de resultados, conclusiones y perspectivas

8.1- Resumen de resultados

1. Se obtuvieron D-ribosa 5-fosfato, D-desoxirribosa 5-fosfato y D-arabinosa 5-fosfato mediante el uso de una estrategia quimio-enzimática versátil partiendo de los azúcares naturales. Para ello, se estudió la regioselectividad de las reacciones de desprotección mediante reacciones de hidrólisis biocatalizadas utilizando diversas fuentes enzimáticas, hallándose regioselectividades distintas dependiendo del tipo de pentosa. También se llevó adelante un método de obtención del difenil (3-azido-3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilofuranosa) fosfato.
2. Se logró sobreexpresar con buen rendimiento y alta pureza, la PPM de *E. coli* utilizando métodos habituales de biología molecular. Se determinaron las condiciones experimentales óptimas para la reacción de síntesis de nucleósidos a partir de las furanosas 5-fosfato.
3. Se exploró la generalidad de esta aproximación sintética, utilizando como biocatalizador el sistema enzimático acoplado (PPM + NPs), partiendo de las furanosas 5-fosfato sintetizadas previamente y distintas bases comerciales. De esta forma se han obtenido con altos rendimientos (70-100%) los nucleósidos: adenosina, inosina, 6-mercaptopurín ribonucleósido, 1,2,4-triazol-3-carboxamida ribonucleósido (Rivabirina), timidina, 2'-desoxiuridina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina y 5-bromo-2'-desoxiuridina. Asimismo se han obtenido diversos nucleósidos con moderados rendimientos (30-50%), tales como la guanosina, 2-amino-6-cloro-purín ribonucleósido, 2-fluoroadenosina e hipoxantín arabinonucleósido. Finalmente se han obtenido con escaso rendimiento (10-30%) los siguientes nucleósidos: adenín arabinonucleósido, 6-mercaptopurín arabinonucleósido, 1,2,4-triazol-3-carboxamida arabinonucleósido, 2'-desoxiinosina y 2-amino-6-cloro-purín 2'-desoxirribonucleósido.

4. Se ensayaron diferentes estrategias para la inmovilización de la PPM, encontrándose que la más eficiente consistió en el atrapamiento de la enzima en materiales híbridos de sílica-quitosano preparados mediante la tecnología sol-gel, utilizando THEOS como precursor y procesados por la metodología de ISISA. Luego se co-inmovilizaron exitosamente la PPM y PNP en el sol-gel híbrido sílica-quitosano, mostrando una elevada estabilidad operacional. Por último se trabajó con mayores concentraciones de sustrato, demostrándose que pueden utilizarse concentraciones de hasta 30 mM con buenos rendimientos, a tiempos cortos.
5. Se generó el modelo estructural de la PPM de *E. coli* por la metodología de modelado por homología. Luego se localizó el sitio de unión a ligandos por diversos medios. Finalmente se determinó aproximadamente el modo de unión de los ligandos mediante experimentos de acoplamiento molecular o *docking*. Estos experimentos revelan dos posibles modos de unión para los ligandos estudiados, en los cuales intervienen los mismos residuos.

8.2- Conclusiones y perspectivas

En primer lugar, se ha presentado una estrategia quimio-enzimática versátil para la síntesis de diversas furanosas 5-fosfato partiendo de los azúcares libres. Con este fin, se protegieron químicamente todas las funciones hidroxílicas de diversas pentosas, para luego evaluar la regioselectividad de las reacciones de hidrólisis biocatalizadas por diversas fuentes enzimáticas. Se encontró que, usualmente, estas reacciones eran regioselectivas para la posición 5, pero sorpresivamente, se observó que ciertas pentosas eran regioselectivamente desprotegidas en posiciones secundarias. Éstas fueron:

- La desacetilación enzimática utilizando CRL del metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-xilofuranósido así como de su análogo 3,5-di-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-xilofuranósido, que proporcionó los productos desacetilados en la posición 3.
- La desacetilación del butil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-xilofuranósido utilizando porciones de banana, que procedió regioselectivamente dependiendo de la configuración del carbono anomérico, obteniéndose únicamente de forma pura el anómero β desprotegido en la posición 2, es decir el butil 3,5-di-*O*-acetil- β -D-xilofuranósido.

- La desacetilación utilizando porciones de banana del metil 2,3,5-tri-*O*-acetil- α,β -D-arabinofuranósido, que procedió con elevada regioselectividad, obteniéndose como producto mayoritario el arabinósido desacetilado en la posición 2, a conversiones de reacción moderadas.

Estas furanosas desprotegidas en hidroxilos secundarios podrían utilizarse como posibles precursores en la síntesis de diversas furanosas 5-fosfatos modificadas. La síntesis de estos compuestos sería de interés con el fin de:

- Evaluar la posible síntesis de diversos nucleósidos modificados en el azúcar, utilizando el sistema enzimático acoplado descrito en esta tesis.
- Extender la información relativa a la especificidad de sustrato de la PPM en estudio.

Esto último es de gran interés ya que la especificidad de sustrato de la PPM de *E. coli* ha sido pobremente estudiada, habiéndose ensayado sólo las actividades relativas de la D-ribosa 5-fosfato, 2-desoxi-D-ribosa 5-fosfato, D-arabinosa 5-fosfato y 2,3-didesoxi-D-ribosa 5-fosfato. Asimismo, el estudio de la selectividad de la enzima contra diversos sustratos podría ser de utilidad para complementar el experimento de acoplamiento molecular o *docking* realizado sobre el modelo obtenido de la PPM.

Con respecto a la síntesis de nucleósidos llevada a cabo en este trabajo de tesis, se observó que, en general, los ribo- y desoxirribonucleósidos fueron obtenidos con elevados rendimientos utilizando el sistema enzimático acoplado, mientras que los arabinósidos correspondientes se obtuvieron con rendimientos menores. Como se ha descrito anteriormente, esto podría deberse a la especificidad de la NPs más que a la de la PPM, para la cual se reportó que la D-arabinosa-5-fosfato presentaba una actividad relativa similar a la del sustrato natural. Con el objeto de obtener arabinonucleósidos con altos rendimientos, se debería acoplar la PPM sobreexpresada a NPs que acepten más eficientemente como sustrato la D-arabinosa 1-fosfato. Diversos estudios realizados por nuestro grupo¹ demostraron que es posible sintetizar arabinonucleósidos purínicos utilizando células enteras de *E. coli* BL21, partiendo de arabinonucleósidos pirimidínicos y bases purínicas. Por lo que es posible obtener arabinonucleósidos con elevados rendimientos utilizando como biocatalizador el sistema enzimático acoplado formado por la PPM y células enteras de *E. coli* BL21.

¹ Rogert, M.; Martínez, N.; Porro, S.; Lewkowicz, E.; Iribarren, A.; *Molecules*, 2000, 5, 535.

Por otra parte, la inmovilización de la PPM y la PNP permitió el re-uso de estos biocatalizadores al menos durante 7 ciclos sin observarse pérdidas significativas de la actividad. Este resultado preliminar permitiría abordar futuros estudios de escalado a nivel multigramo de la reacción, con el objeto de evaluar su potencial utilidad tecnológica. Asimismo, la inmovilización de los biocatalizadores permitiría estudiar el posible uso de co-solventes orgánicos con el objeto de aumentar la solubilidad de las bases, factor usualmente limitante en las reacciones en medios acuosos

Por último, se llevó adelante un modelo estructural de la PPM utilizando herramientas bioinformáticas, determinando un sitio aproximado de unión de los ligandos. Esto se realizó con el fin de comprender el mecanismo por el cual esta enzima ejerce su especificidad, permitiendo de esta forma el diseño racional de mutantes con el objeto de disminuir dicha especificidad. Debido a que la determinación realizada por experimentos de *docking* no es suficiente para demostrar fehacientemente el modo de unión de los sustratos al sitio activo de la enzima, es decir los aminoácidos involucrados y su posición, restaría realizar ensayos de mutagénesis dirigida de forma de demostrar que estos aminoácidos son fundamentales para la unión del ligando, además de los correspondientes ensayos bioquímicos confirmatorios.