

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: ES 2 037 600

⑫ Número de solicitud: 9101968

⑬ Int. Cl.⁵: C12P 19/36

C12N 13/00

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: 02.09.91

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: 16.06.93

Fecha de concesión: 17.12.93

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: 01.02.94

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.02.94

⑲ Titular/es: **Universidad de Zaragoza**
Ciudad Universitaria, Pl. S. Francisco s/n
Zaragoza, ES

⑳ Inventor/es: **Pueyo Dabad, José Javier y**
Gómez-Moreno Calera, Carlos

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Procedimiento para la regeneración fotoquímica de dinucleótido de nicotinamida y de adenina fosfato reducido (NADPH).**

㉓ Resumen:

Procedimiento para la regeneración fotoquímica de dinucleótido de nicotinamida y de adenina fosfato reducido (NADPH).

El sistema consta como elemento central de una célula de ultrafiltración (A) equipada con una membrana que permite el paso de moléculas de peso molecular inferior a 5.000 daltons, y que constituye el biorreactor donde se realiza la conversión del NADP⁺ en NADPH. En el interior de la célula se encuentran inmovilizadas la enzima FNR y la proteína transportadora de electrones flavodoxina, que debido a su peso molecular no pueden atravesar la membrana. La mezcla de reactivos, que contiene proflavina como fotosensibilizador, EDTA como sustrato sacrificial y NADP⁺, se halla en un depósito (B) y se introduce en la célula mediante presión. Se ilumina la célula con una lámpara halógena (C) equipada con un filtro azul (F). El NADP⁺ es reducido a NADPH y se recogen las fracciones de salida en el colector (E).

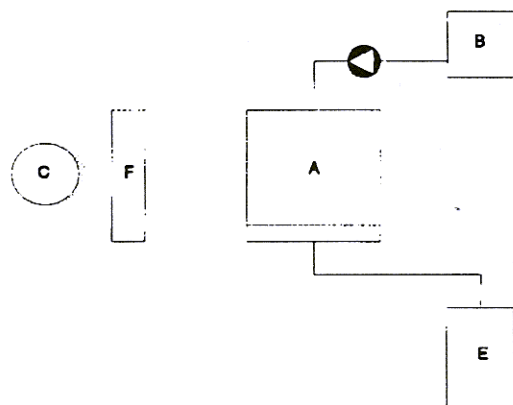


Figura 3

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Dpto. INFORMACION TECNOLÓGICA
RECROGRAFIA
Panamá, 1 - Madrid 28071

Aviso: Se puede realizar la consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Síntesis fotoquímica de nucleótidos reducidos.

En la fotosíntesis, la energía luminosa es captada y transformada en energía química por las plantas. En la reacción de la fotosíntesis, la energía de la luz solar provoca la rotura de la molécula de agua, que se descompone en oxígeno e hidrógeno, éste no se libera, sino que queda incorporado en moléculas orgánicas complejas.

Una alternativa a la función fotosintética natural consiste en la construcción de un sistema fotoquímico artificial que, basado en el comportamiento de los compuestos excitables por la luz, pueda llevar a cabo la fotooxidación del agua con la consiguiente formación de compuestos altamente reducidos, ricos en energía, utilizables como combustibles o sustratos para otras reacciones. Los sistemas fotoquímicos artificiales se basan en la utilización de compuestos coloreados (pigmentos) capaces de absorber una determinada radiación luminosa, para pasar así a un estado de excitación electrónica. El acto primario de conversión de la energía luminosa consiste en la captación de un fotón (o cuanto de luz) por parte del pigmento, empleándose la energía del fotón en expeler un electrón a un orbital más externo y con más energía. La molécula pasa de su estado fundamental, estable, a un estado excitado, rico en energía e inestable, lo que induce un cambio en su energía de ionización y, cuando es susceptible de oxidarse o reducirse, en su potencial redox. Esto último ocurre de suerte que, si es la forma oxidada la que absorbe la radiación, el pigmento se vuelve más oxidante al aumentar su afinidad por los electrones, es decir, tiene gran facilidad para reducirse cuando se excita por la luz. Entre estas sustancias adquieren importancia especial las flavinas y otros compuestos estructuralmente relacionados con ellas: las acridinas (como la proflavina). También tienen un comportamiento similar, algunos complejos de coordinación de metales de transición como el rutenio, el molibdeno o el cinc.

Por otra parte, el funcionamiento de un sistema fotoquímico requiere el consumo de un sustrato que actúe suministrando electrones, ya sea un reductor natural o cualquier otro compuesto estable que dé lugar a la formación de subproductos oxidados de forma irreversible. Idealmente, el donador terminal de electrones debería ser el agua, como ocurre en la fotosíntesis vegetal, pero ello aún no se ha conseguido de manera eficiente. El fotosensibilizador actúa como pigmento receptor de luz con la misión de catalizar la transferencia de electrones desde un compuesto utilizado como donador como puede ser el EDTA, que se consumirá en el proceso. Tras la absorción de luz, el pigmento queda en un estado excitado rico en energía -la energía de la luz queda almacenada en la molécula excitada-, muy inestable, que desaparece en millonésimas de segundo. No obstante, a pesar de su efímera existencia, y debido a su alto contenido energético, que le proporciona una enorme reactividad química, la flavina excitada puede reaccionar, con otra molécula y arrancarle un electrón.

Así pues, cuando la iluminación del fotosensi-

bilizador se realiza en presencia de un sustrato a concentración elevada, el pigmento fotoexcitado puede interaccionar con una molécula de dicho sustrato y oxidarla, quedando aquél reducido. El fotosensibilizador oxidado puede aceptar un electrón a un potencial más alto y cederlo posteriormente a un potencial más bajo. De esta forma, estos pigmentos excitados por la luz pueden promover un flujo de electrones contra gradiente, desde compuestos relativamente oxidados (pobres en energía) a otros más reducidos (ricos en energía), actuando así de forma parecida a como lo hace la clorofila en los centros de reacción del aparato fotosintético.

La enzima fotosintética ferredoxina-NADP⁺ reductasa realiza la reducción del NADP⁺ en la fotosíntesis (ver figura 1), obteniendo el poder reductor necesario para ello del fotosistema I a través de la ferredoxina. Esta última proteína puede ser sustituida en determinados casos por otra denominada flavodoxina.

Los nucleótidos piridínicos reducidos NADH y NADPH juegan un papel esencial como cofactores de muchas reacciones enzimáticas. Muchos productos químicos y farmacéuticos pueden sintetizarse a través de reacciones enzimáticas en las cuales los cofactores reducidos deben estar presentes en cantidades estequiométricas. Debido al alto coste de estos compuestos se han desarrollado diversos métodos para la regeneración a escala industrial de nucleótidos reducidos [por ejemplo: Okura, I., Kurabayashi, K and Aono, S. Regeneration of NADPH and hydrogenation of ketones to alcohols with the combination of hydrogenase, ferredoxin-NADP reductase and alcohol dehydrogenase. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1987, 60, 3662-3666; Chenault, H.K. and Whitesides, G.M. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. Appl. Biochem. & Biotechnol. 1987, 4, 147-197; Simon, H., Bader, J., Günther, H Newman, S. and Thanos, J. Chiral compounds synthesized by biocatalytic reductions. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1985, 24, 539-553].

Los procedimientos más simples descritos para producir grandes cantidades de nucleótidos piridínicos requieren el uso de preparaciones crudas o purificadas de enzimas apropiadas y sus correspondientes sustratos [Wong, C.H. and Whitesides, G.M. Enzyme-catalyzed organic synthesis Regeneration of deuterated nicotinamide cofactors for use in large-scale enzymatic synthesis of deuterated substances, J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 4890-4899; Suye, S. and Yokoyama, S. NADPH production from NADP⁺ using malic enzyme of *Achromobacter parvulus* IFO-13182. Enzyme Microb. Technol. 1985, 7, 418-424] procesos que presentan problemas que los hacen difícilmente aplicables.

En relación con la reducción del NADP⁺ se han utilizado sistemas fotoquímicos y electroquímicos. Un sistema utiliza el cátodo para reducir el metil viologen, que transfiere los electrones a la enzima FNR [Day, R.J. Kinsey, S.J. Seo. E.T., Weliky, N. and Silverman. H.P. Electrochemically driven biochemical reactions: I. Reduction of pyridine nucleotides in aqueous solution. Trans. N.Y. Acad. Sci. 1972, 32, 588-594]. En una publicación posterior el ciclo de regeneración del

NADPH se ha utilizado para la síntesis orgánica mediante enzimas acopladas que utilizan el nucleótido piridínico reducido [DiCosimo, R., Wong, C.H. Daniels, L. and Whitesides, G.M. *Enzyme-catalyzed organic synthesis: Electrochemical regeneration of NAD(P)H from NAD(P) using methyl viologen and flavoenzymes.* *J. Org. Chem.* 1981, 46, 4623-4625]. El método fotoquímico utiliza el fotosensibilizador Ru(bpy) soluble en agua [Mandler, D. and Willner, I. *Photosensitized NAD(P)H regeneration systems: application in the reduction of butan-2-one, pyruvic and acetoacetic acids and in the reductive amination of pyruvic and oxoglutaric acid to amino acids.* *J. Soc. Perkin Trans.* 1986, 2, 805-811] o los semiconductores CdS o TiO₂ [Goren, Z., Lapidot, N. and Willner, I. *Photocatalyzed regeneration of NAD(P)H by CdS and TiO₂ semiconductors: applications in enzymatic synthesis.* *J. Mol. Catal.* 1988, 47, 21-32] para reducir el metil viologen que a su vez reduce la enzima.

La presente invención contempla la reducción fotoquímica continua del NADP⁺ por la enzima ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR) en presencia de un transportador de electrones, la ferredoxina (o flavodoxina), que actúan conjuntamente en las reacciones fisiológicas catalizadas por esta enzima. El NADPH así obtenido puede ser utilizado para la síntesis enzimática de un gran número de compuestos biológicamente activos o fármacos de gran valor añadido.

El fotosistema para la producción de NADPH puede representarse con el esquema que se muestra en la figura 2, que describimos a continuación:

La flavina o fotosensibilizador capta la luz azul y se excita pudiendo ser reducido por un donador que, en el sistema descrito, es el EDTA pero podrían ser muchos otros compuestos de diferente naturaleza química. La flavina puede reducir directamente a la enzima ferredoxina-NADP⁺ reductasa pero la utilización de un medidor, que puede ser una proteína transportadora de electrones como la ferredoxina o la flavodoxina, aumenta notablemente la eficacia del sistema.

La enzima FNR y las proteínas ferredoxina y flavodoxina pueden obtenerse de cualquier organismo vegetal tal como las hojas de plantas o las algas. También se pueden aislar, de manera mucho más fácil y abundante, de cultivos de bacterias que han sido modificadas mediante técnicas de ingeniería genética para que produzcan dichas proteínas.

El componente más valioso en un sistema enzimático suele ser el enzima y por ello, si se desea obtener una cierta rentabilidad, se precisa que

éste no sea desperdiciado. En este caso la inmovilización del enzima en un soporte sólido no es conveniente, ya que, como el sistema es dependiente de la luz, es preciso que el soporte sea transparente. Por otra parte es necesario también inmovilizar la proteína transportadora, pues es tan valiosa como el enzima, y finalmente hay que conseguir que ambas proteínas interaccionen y que su actividad no sea disminuida por la inmovilización. La solución óptima para solventar esta serie de condicionamientos, es la inmovilización en una célula de ultrafiltración equipada con una membrana que impide el paso de las moléculas grandes, que son el enzima y la proteína transportadora, pero que permite el paso de los productos de reacción. En el biorreactor, donde están inmovilizadas las proteínas, se introduce una mezcla conteniendo proflavina, EDTA y NADP⁺, se ilumina y se obtiene a la salida una mezcla enriquecida en NADPH. La cantidad de NADPH producida es dependiente del tiempo de residencia de la mezcla en la célula-biorreactor, pero puede llegar a ser más del 80 % respecto al NADP⁺. La flavina utilizada sale del biorreactor con el NADPH, producto de la reacción, y dado que no es consumida en la reacción, puede ser utilizada de nuevo aplicando un procedimiento no destructivo para la separación del NADPH, como puede ser la ultrafiltración a través de una membrana de límite de peso molecular 500 daltons.

En la figura 3 se muestra la manera de llevar a cabo el procedimiento objeto de la presente invención; el sistema consta, como elemento central, de una célula de ultrafiltración (A) equipada con una membrana que permite el paso de moléculas de peso molecular inferior a 5.000 daltons, y que constituye el biorreactor donde se realiza la conversión del NADP⁺ en NADPH. En el interior de la célula se encuentran inmovilizadas la enzima FNR y la proteína transportadora de electrones flavodoxina, que debido a su peso molecular no pueden atravesar la membrana.

La mezcla de reactivos, que contiene proflavina como fotosensibilizador, EDTA como sustrato sacrificial y NADP⁺, se halla en un depósito (B) y se introduce en la célula mediante presión. Se ilumina la célula con una lámpara halógena (C) equipada con un filtro azul (F). El NADP⁺ es reducido a NADPH y se recogen las fracciones de salida en el colector (E).

Es posible la sustitución de la flavodoxina por ferredoxina u otros transportadores de electrones. Asimismo pueden utilizarse otros donadores de electrones en lugar de EDTA y otros fotosensibilizadores en sustitución de la proflavina.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la regeneración fotoquímica de dinucleótido de nicotinamida y de adenina fosfato reducido (NADPH) utilizando la enzima ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR) y la proteína flavodoxina como transportador de electrones, **caracterizado** por la inmovilización de estas proteínas en una célula de ultrafiltración equipada con una membrana que impide el paso de las moléculas grandes, que son el enzima y la proteína transportadora, pero que permite el paso de los productos de reacción.

2. Procedimiento para la regeneración fotoquímica de dinucleótido de nicotinamida y de adenina fosfato reducido (NADPH), según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la célula de ultrafiltración se ilumina con una lámpara halógena equipada con un filtro azul.

3. Procedimiento para la regeneración fotoquímica de dinucleótido de nicotinamida y de

adenina fosfato reducido (NADPH), según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizada** porque la célula de ultrafiltración tiene una membrana de límite de peso molecular 500 daltons.

4. Procedimiento para la regeneración fotoquímica de dinucleótido de nicotinamida y de adenina fosfato reducido (NADPH), según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque se introduce en el biorreactor, donde están inmovilizadas las proteínas, una mezcla conteniendo proflavina, EDTA y NADP⁺.

5. Procedimiento para la regeneración fotoquímica de dinucleótido de nicotinamida y de adenina fosfato reducido (NADPH), según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque es posible la sustitución de la flavodoxina por ferredoxina u otros transportadores de electrones. Asimismo pueden utilizarse otros donadores de electrones en lugar de EDTA y otros fotosensibilizadores en sustitución de la proflavina.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

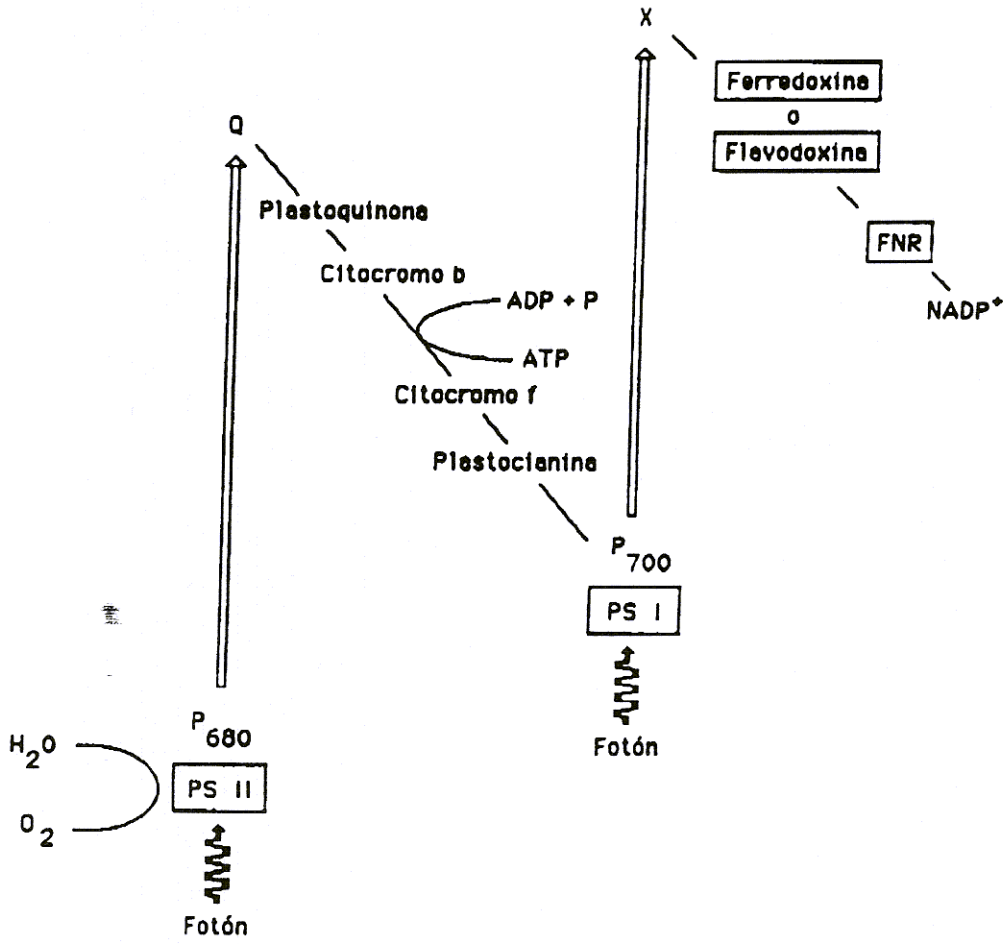


Figura 1

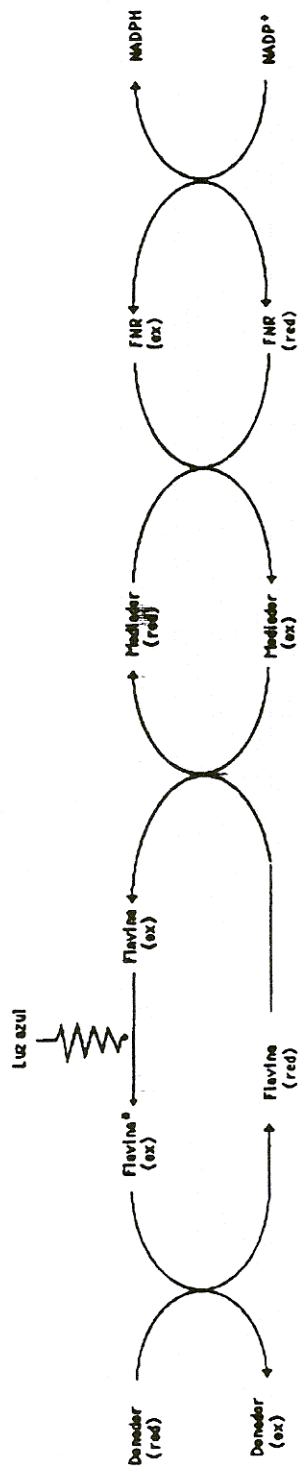


Figura 2

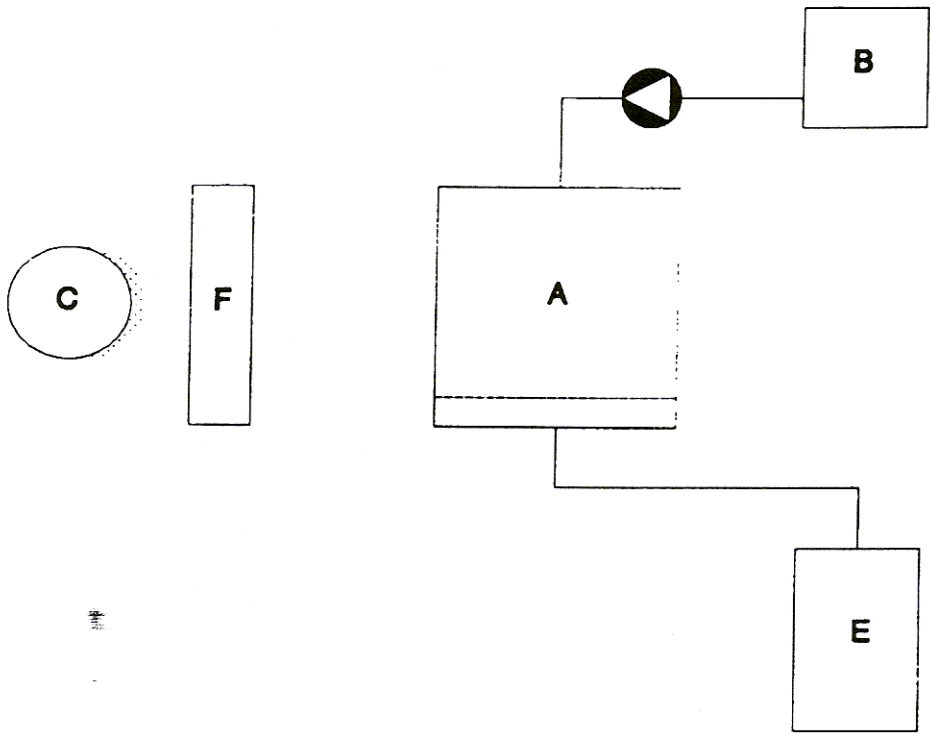


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 037 600

② N.º solicitud: 9101968

③ Fecha de presentación de la solicitud: 02.09.91

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁵: C12P 19/36, C12N 13/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| Y | ALBERT L. LEHNINGER "Bioquímica Lehninger" Segunda edición *Páginas 618-619* | 1-5 |
| Y | US-A-4352885 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FUNDATION) *Documento completo* | 1-5 |
| A | FR-A-2346449 (CORNING GLASS WORKS) | |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

16.09.92

Examinador

M. Ybarra Fernández

Página

1/1