



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 343 448**

② Número de solicitud: 200900254

⑤ Int. Cl.:

C07H 3/02 (2006.01)

C07C 45/45 (2006.01)

C07C 49/17 (2006.01)

C12P 7/26 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **29.01.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2010**

Fecha de la concesión: **08.06.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **20.06.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
20.06.2011

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 50 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Bioglane S.L.N.E. (Titular al 50 %)

⑱ Inventor/es: **Joglar Tamargo, Jesús;**
Concia, Alda Lisa;
Castillo Expósito, José Antonio;
Clapés Saborit, Pedro y
Lozano Pérez, Carles

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Procedimiento quimo-enzimático para la síntesis de 1-deoxi-D-xilulosa.**

㉒ Resumen:

Procedimiento quimo-enzimático para la síntesis de 1-deoxi-D-xilulosa.

Procedimiento para la obtención de 1-deoxi-D-xilulosa que comprende la adición aldólica de benciloxiacetaldehído a hidroxiacetona catalizado por FSA para obtener 5-O-bencil-1-deoxi-D-xilulosa; y posterior eliminación del grupo bencilo del aducto, 5-O-bencil-1-deoxi-D-xilulosa, mediante hidrogenolisis catalítica para dar lugar a 1-deoxi-D-xilulosa.

ES 2 343 448 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento quimo-enzimático para la síntesis de 1-deoxi-D-xilulosa.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento quimo-enzimático para la síntesis de 1-deoxi-D-xilulosa. Por tanto, la invención se encuadra en el sector químico y biotecnológico.

Estado de la técnica

10 La 1-deoxi-D-xilulosa es una pentulosa de gran importancia pues se incorpora con facilidad a la ruta metabólica del mevalonato (independiente de metileritriol fosfato) para la biosíntesis de isoprenoides, que tienen lugar en bacterias y plantas. El interés en la biosíntesis de difosfato de tiamina, fosfato de piridoxal e isoprenoides ha despertado muchas expectativas en la 1-deoxi-D-xilulosa para usos biotecnológicos. Por ejemplo la 1-deoxi-D-xilulosa es particularmente valiosa en la producción biotecnológica de terpenos, ketocarotenoides o vitamina B6, entre otros productos de interés.

15 En la actualidad existen diferentes síntesis quimo-enzimáticas para la obtención de 1-deoxi-D-xilulosa. Algunos de los métodos de síntesis de este compuesto tienen un número de etapas elevado. En una de estas síntesis se describe la reacción entre un tioanálogo del fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) y la hidroxiacetona (HA), biocatalizada con la enzima fructosa bifosfato aldolasa (Duncan, R.; Drucekhammer, D. G., (1996), *J. Org. Chem.*, 61, (2), 438-439), obteniéndose el compuesto mediante unas cuatro etapas de síntesis. Además, como consecuencia de que el procedimiento tenga al menos cuatro etapas, los rendimientos globales de síntesis no son muy altos.

20 En otros procedimientos de síntesis se han utilizado anticuerpos monoclonales como catalizadores (Shabat, D., *et al.*, (1999), *Tetrahedron Lett.*, 40, (8), 1437-1440), como el anticuerpo monoclonal Ab 38C2. En estos momentos los anticuerpos monoclonales como catalizadores están en desuso debido a su compleja obtención y los pobres resultados en cuanto a eficiencia catalítica. En el caso del uso de Ab 38C2, el rendimiento de la reacción catalítica es de un 32% y el rendimiento global es del 23% sin contar con las etapas de purificación.

25 En consecuencia, el encontrar una metodología simple y efectiva para la producción de 1-deoxi-D-xilulosa es de clara importancia estratégica para la producción de metabolitos importantes a partir de cultivos de plantas o bacterias.

Descripción de la invención

30 La presente invención proporciona un procedimiento quimo-enzimático útil para la preparación de 1-deoxi-D-xilulosa basado en la utilización de la enzima D-fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA).

35 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de 1-deoxi-D-xilulosa (esquema 1), que comprende las siguientes etapas:

- 40 a) la adición aldólica de benciloxiacetaldehído a hidroxiacetona catalizado por FSA para obtener 5-O-bencil-1-deoxi-D-xilulosa; y
- 45 b) eliminación del grupo bencilo del aducto, 5-O-bencil-1-deoxi-D-xilulosa, mediante hidrogenolisis catalítica para dar lugar a 1-deoxi-D-xilulosa.

50 La hidrogenolisis catalítica del paso (b) del procedimiento de la invención consiste en la adición de H₂ en presencia de un catalizador, preferiblemente un catalizador metálico.

“Catalizador metálico” se refiere en esta invención a un catalizador cuya función en procesos de hidrogenación es conocida por un experto en la materia. Preferiblemente este catalizador metálico se puede seleccionar del grupo que comprende Pd, Ni, Pt, Ru o Rh. Más preferiblemente el catalizador metálico es Pd/C.

55 El procedimiento de la invención presenta ventajas con respecto a las síntesis quimo-enzimáticas existentes en el estado de la técnica, al tener un número de etapas menor, rendimientos globales más altos y una muy alta estereoespecificidad. Así, por ejemplo:

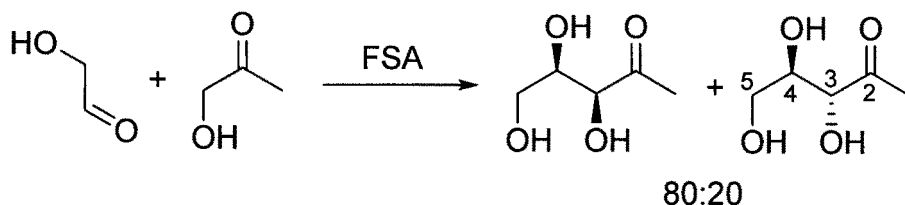
60 - la FSA utiliza HA en la reacción de adición aldólica en lugar del tioanálogo de DHAP, eliminándose un total de 4 etapas sintéticas (sin contar la preparación del tioanálogo de DHAP y del benciloxiacetaldehído) en comparación con la metodología con aldolasas DHAP-dependientes, mencionadas en los antecedentes. En la presente invención se elimina el paso de hidrólisis del grupo tiofosfato.

65 - La obtención y purificación de la FSA es simple y de bajo coste. Como biocatalizador la FSA es estable a 4°C como mínimo durante siete meses sin pérdida de actividad, y además no utiliza ni genera residuos tóxicos, como sí ocurre, por ejemplo, en el caso de utilizar las DHAP-aldolasas, al emplear dihidroxiacetona (DHA) en presencia de sales de arsénico, producto altamente tóxico y, por tanto, peligroso para la salud y el medio ambiente.

ES 2 343 448 B1

- El benciloxiacetaldehído como sustrato da lugar a una reacción aldólica altamente estereoselectiva, mientras que la utilización de glicolaldehído da lugar a epimerización del producto en C3. De esta forma, se procedió a una síntesis según el esquema 1 utilizando glicolaldehído, dando lugar a un 51% de rendimiento global de un material que es mezcla 80:20 de dos diastereoisómeros tal y como se indica:

Esquema 1



mientras que el rendimiento global del proceso de síntesis descrito en la presente invención, utilizando benciloxiacetaldehído, es de un 70%.

- FSA tiene capacidad de controlar la estereoquímica de la adición aldólica y, por tanto, la configuración de los nuevos centros estereogénicos creados depende del enzima y no de los reactivos de la adición aldólica.

Es conocida la capacidad sintética de la FSA de catalizar la adición aldólica entre la DHA y el gliceraldehído-3-fosfato para formar fructosa-6-fosfato (Schürmann, M.; Sprenger, G. A. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 11055). También es conocida su capacidad sintética en adiciones aldólicas de DHA con otros aldehídos tipo glicolaldehído, D-gliceraldehído y D-eritrosa. Sin embargo, en ningún caso los aductos de adición aldólica catalizados por FSA fueron caracterizados inequívocamente por técnicas espectroscópicas ni la estereoquímica de estos aductos resuelta. Por tanto, no podía deducirse *a priori* que el aldehído de benciloxiacetaldehído fuera sustrato o reactivo de la FSA ni que la estereoquímica final de la reacción fuera la adecuada para el producto de la presente invención.

En una realización preferida de la presente invención, la enzima D-fructosa-6-fosfato aldolasa se corresponde con la FSA de *E. coli* de SEQ ID NO:1.

En dicha realización preferida de la presente invención, la FSA utilizada ha sido clonada en la cepa *E. coli* MC4100, derivada de la cepa de *E. coli* K-12 (Schürmann, M.; Sprenger, G. A. *J. Biol. Chem.* (2001) 276 11055; Casadaban, M. J. (1976) *J. Mol. Biol.* 104, 541-555) y purificada posteriormente. Dicha FSA consiste en la forma salvaje de enzima D-fructosa-6-fosfato aldolasa que de forma natural se expresa en *E. coli* y cuya secuencia de aminoácidos se corresponde con la SEQ ID NO:1. Cualquier otra enzima D-fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA) salvaje puede ser aislada e identificada en otros microorganismos gracias a la información y procedimientos existentes en el estado de la técnica y a la descripción de la presente invención. Por lo tanto, una realización preferida de la presente invención lo constituye el procedimiento de invención donde la enzima FSA es una enzima de secuencia análoga a la SEQ ID NO:1.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser aislada de un microorganismo o por mutagénesis dirigida y que posea la capacidad de adición aldólica entre la DHA y un benciloxiacetaldehído aceptor. En general, una secuencia de aminoácidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de aminoácidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 30%, preferentemente de, al menos, un 75%, más preferentemente de, al menos, un 85%, o aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

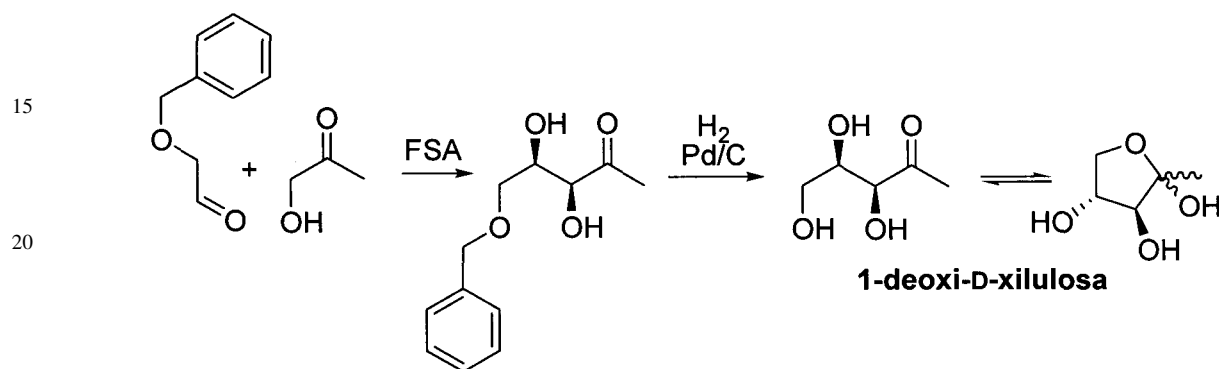
Ejemplo

Síntesis de 1-deoxi-D-xilulosa

5 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que ponen de manifiesto la estereoselectividad y efectividad del procedimiento de la invención (Esquema 2).

Esquema 2

10

1^{er} Paso*Adición aldólica de hidroxiacetona a benciloxiacetaldehído. Síntesis de 5-O-bencil-1-deoxi-D-xilulosa*

30

HA (0.68 g, 9.2 mmol) y aldolasa FSA en polvo (0.113 g, 47 U) se disolvieron en tampón ácido bórico/borato 50 mM pH 7.0 (80 mL). A esta mezcla se le añadió benciloxiacetaldehído (1.16 g, 7.7 mmol) disuelto en DMF (20 mL). La mezcla de reacción se colocó en un agitador orbital (120 rpm) a 25°C. Transcurridas 24 h la conversión alcanzó el 99%. La purificación por cromatografía de columna con gel de sílice (elución con una mezcla de acetato de etilo/hexano de 4:1 a 1:1) proporcionó 1.2 g, (71%) de 5-O-bencil-1-deoxi-D-xilulosa. $[\alpha]_{D22} = +58.2$ (c 1.12 en CH_2Cl_2) (valores de la literatura (Giner, J.-L., New and efficient synthetic routes to 1-deoxy-D-xylulose. (1998) *Tetrahedron Lett.*, 39, (17), 2479-2482). $[\alpha]_{D20} = +52.5$ (c 1.17 en CH_2Cl_2)) $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) = 7.30 (m, 5H), 4.54 (s, 2H), 4.21 (d, J=1.9, 1H), 4.16 (td, J=2.0, 6.2, 1H), 3.64 (sistema AB, J=6.5, 9.5, 1H), 3.55 (sistema AB, J=6.2, 9.5, 1H), 2.22 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) = 212.1, 139.7, 129.5, 129.0, 128.8, 78.9, 74.5, 72.1, 72.0, 26.8.

35

40

2^o Paso*Desprotección del grupo bencilo de 5-O-bencil-1-deoxi-D-xilulosa, por hidrogenolisis con H₂ en presencia de paladio. Obtención de 1-deoxi-D-xilulosa*

45

5-O-bencil-1-deoxi-D-xilulosa fue disuelta en metanol (100 mL), se añadió 10% Pd/C como catalizador (100 mg) y se agitó a temperatura ambiente bajo presión de H_2 (50 psi) durante la noche (aproximadamente 12 h). A continuación se filtró la mezcla a través de una membrana de nylon de 0,45 mm y se evaporó el disolvente; el residuo se disolvió en agua y se liofilizó para dar 1-deoxi-D-xilulosa como un sólido blanco (600 mg, 99%). $[\alpha]_{D22} = +54.1$ (c 1.11 en H_2O) (valores de la literatura (Kennedy, I. A.; Hemscheidt, T.; Britten, J. F.; Spenser, I. D., 1-Deoxy-D-xylulose (1995) *Can. J. Chem.*, 73, (8), 1329-37). $[\alpha]_{D20} = +22.4$ (c 1.10 en H_2O) $[\alpha]_{D22} = +8.8$ (c 1.9 en CH_3OH)(valores de la literatura (Blagg, B. S. J.; Poulter, n C. D., Synthesis of 1-Deoxy-D-xylulose and 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate. (1999) *J. Org. Chem.*, 64, (5), 1508-1511, $[\alpha]_{D20} = -1.7$ (c 1.8 en CH_3OH)).

50

55

60

65

ES 2 343 448 B1

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de 1-deoxi-D-xilulosa que comprende las siguientes etapas:

5

- a. la adición aldólica de benciloxiacetaldehído a hidroxiacetona catalizado por la enzima D-fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA); y
- b. eliminación del grupo bencilo del compuesto obtenido en (a) mediante hidrogenólisis catalítica.

10

2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde en el paso (b) la hidrogenólisis se lleva a cabo en presencia de un catalizador metálico seleccionado del grupo que comprende Pd, Ni, Pt, Ru o Rh.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, donde el catalizador es Pd/C.

15

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la enzima FSA del paso (a) tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO:1.

20

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde FSA es una enzima cuya secuencia aminoacídica presenta una identidad de al menos un 75% con SEQ ID NO:1.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, donde FSA es una enzima cuya secuencia aminoacídica presenta una identidad de al menos un 85% con SEQ ID NO:1.

25

7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde FSA es una enzima cuya secuencia aminoacídica presenta una identidad de al menos un 95% con SEQ ID NO:1.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 343 448 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Bioglane SLNE

5 <120> Procedimiento quimo-enzimático para la síntesis de 1-deoxi-D-xilulosa

<130> ES1641.202

10 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 220

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

20 <400> 1

25 Met Glu Leu Tyr Leu Asp Thr Ser Asp Val Val Ala Val Lys Ala Leu
1 5 10 15

30 Ser Arg Ile Phe Pro Leu Ala Gly Val Thr Thr Asn Pro Ser Ile Ile
20 25 30

35 Ala Ala Gly Lys Lys Pro Leu Asp Val Val Leu Pro Gln Leu His Glu
35 40 45

40 Ala Met Gly Gly Gln Gly Arg Leu Phe Ala Gln Val Met Ala Thr Thr
50 55 60

45 Ala Glu Gly Met Val Asn Asp Ala Leu Lys Leu Arg Ser Ile Ile Ala
65 70 75 80

50 Asp Ile Val Val Lys Val Pro Val Thr Ala Glu Gly Leu Ala Ala Ile
85 90 95

55 Lys Met Leu Lys Ala Glu Gly Ile Pro Thr Leu Gly Thr Ala Val Tyr
100 105 110

60 Gly Ala Ala Gln Gly Leu Leu Ser Ala Leu Ala Gly Ala Glu Tyr Val
115 120 125

65 Ala Pro Tyr Val Asn Arg Ile Asp Ala Gln Gly Gly Ser Gly Ile Gln
130 135 140

70 Thr Val Thr Asp Leu His Gln Leu Leu Lys Met His Ala Pro Gln Ala
145 150 155 160

75 Lys Val Leu Ala Ala Ser Phe Lys Thr Pro Arg Gln Ala Leu Asp Cys
165 170 175

ES 2 343 448 B1

Leu Leu Ala Gly Cys Glu Ser Ile Thr Leu Pro Leu Asp Val Ala Gln
180 185 190

5

Gln Met Ile Ser Tyr Pro Ala Val Asp Ala Ala Val Ala Lys Phe Glu
195 200 205

10

Gln Asp Trp Gln Gly Ala Phe Gly Arg Thr Ser Ile
210 215 220

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 343 448

② Nº de solicitud: 200900254

③ Fecha de presentación de la solicitud: 29.01.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 6326176 B1 (BARBAS et al) 04.12.2001, (todo el documento).	1-7
A	Shabat D. et al. A short enantioselective synthesis of 1-deoxy-L-xylulose by antibody catalysis. Tetrahedron Letters. 1999, Vol. 40, páginas 1437-1440, ISSN 0040-4039/99 (todo el documento).	1-7
A	Schürmann M. et al. Fructose-6-phosphate aldolase and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase from Escherichia coli as tools in enzymatic synthesis of 1-deoxysugars. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2002, Vol. 19-20, páginas 247-252, ISSN 1381-1177/02 (todo el documento).	1-7
A	Blagg B. S. J. et al. Synthesis of 1-deoxy-D-xylulose and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate. J. Org. Chem. 1999, Vol. 64, páginas 1508-1511, doi: 10.1021/jo981966k (todo el documento).	1-7
A	Meyer O. et al. Practical synthesis of 1-deoxy-D-xylulose and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate allowing deuterium labelling. Tetrahedron. 20.10.2004, Vol. 60, páginas 12153-12162, ISSN 0040-4020 (todo el documento).	1-7
A	Schürmann M. et al. Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from Escherichia coli and is related to a novel group of bacterial transaldolases. The Journal of Biological Chemistry. 6.4.2001, Vol. 276, Nº 14, páginas 11055-11061 (todo el documento).	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.06.2010

Examinador

M. Cumbreño Galindo

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 343 448

② N° de solicitud: 200900254

③ Fecha de presentación de la solicitud: 29.01.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2008/067997 A1 (ISOBIONICS B. V.) 12.06.2008, (todo el documento)	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.06.2010

Examinador

M. Cumbreño Galindo

Página

2/6

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H 3/02 (2006.01)

C07C 45/45 (2006.01)

C07C 49/17 (2006.01)

C12P 7/26 (2006.01)

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

C07H, C07C, C12P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, EBI, STN

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200900254

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SÍ
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 6326176 B1	04-12-2001
D02	Shabat D. et al. Tetrahedron Letters. Vol. 40, páginas 1437-1440, ISSN 0040-4039/99	1999
D03	Schürmann M. et al. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 19- 20, páginas 247-252, ISSN 1381-1177/02	2002
D04	Blagg B. S. J. et al. Vol. 64, páginas 1508-1511, doi: 10.1021/jo981966k	1999
D05	Meyer O. et al. Tetrahedron. Vol. 60, páginas 12153-12162, ISSN 0040-4020	20-10-2004
D06	Schürmann M. et al. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 276, Nº 14, páginas 11055-11061	06-04-2001
D07	WO 2008/067997 A1	12-06-2008

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

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de obtención de 1-deoxi-D-xilulosa que comprende las etapas de:

a) adición aldólica de benciloxiacetaldehído a hidroxiacetona catalizado por la enzima d-fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA) b) eliminación del grupo bencilo del compuesto obtenido en (a) mediante hidrogenólisis catalítica (reivindicación 1)

El paso (b) se lleva a cabo en presencia de un catalizador metálico, en concreto Pd/C (reivindicaciones 2 y 3). La enzima FSA del paso (a) tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 o una secuencia que presente una identidad del 75%, del 85% o del 95% con ella (reivindicaciones de la 4 a la 7).

D01 anticipa un método para catalizar reacciones aldólicas entre una cetona o un aldehído que actúen como donador y una cetona o un aldehído que actúen como aceptor para obtener una beta-hidroxicetona. La reacción es catalizada por anticuerpos con actividad aldolasa, en concreto 38C2 y 33F12. Un ejemplo de las reacciones que cataliza 38C2 es la obtención de 1-deoxi-L-xilulosa en dos etapas, reacción altamente enantioselectiva, mediante la adición aldólica de hidroxiacetona a benciloxiacetaldehído obteniéndose la correspondiente alfa,beta-dihidroxicetona que es después transformada en 1-deoxi-L-xilulosa mediante hidrogenación en presencia de paladio en carbono.

D02 presenta una nueva y eficiente síntesis en dos etapas de 1-deoxi-L-xilulosa mediante la adición aldólica de hidroxiacetona a benciloxiacetaldehído, reacción que es catalizada por el anticuerpo 38C2 con actividad aldolasa y que da lugar a la correspondiente alfa,beta-dihidroxicetona 2alfa. Posteriormente, la cetona 2alfa es transformada en 1-deoxi-L-xilulosa mediante hidrogenación en presencia de Pd(OH)2/C (Pd(H2)/C) con un rendimiento del 81%.

D03 expone que la enzima fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA) de E. coli, una nueva aldolasa de clase I, cataliza la formación reversible de fructosa-6-fosfato a partir de dihidroxiacetona y D-gliceraldehído-3-fosfato y utiliza, así mismo, hidroxiacetona como donador y diferentes aldehídos como aceptores para generar 1-deoxiazúcares, entre ellos glicolaldehído como aceptor para obtener 1-deoxixilulosa.

D04 describe la síntesis de 1-deoxi-D-xilulosa y de 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato a partir de (-)-2, 3-O-isopropilideno-D-threitol, el primero de ellos en 5 etapas con un rendimiento total del 69%. Ambos son sustratos en la biosíntesis de vitamina B1, vitamina B6 y de compuestos isoprenoides de bacterias y plantas.

D05 describe un método mejorado para la síntesis a gran escala de 1-deoxi-D-xilulosa o 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato, enantioméricamente puros, a partir de bencilideno-D-treitol o bencilideno-D-tartrato con un alto rendimiento y la posibilidad de introducir deuterio marcado en el C-5.

Hoja adicional

D06 caracteriza la enzima fructosa-6-fosfato aldolasa de Escherichia coli K-12, propone el nombre FSA para la misma y la purifica y describe sus propiedades, cinética y la homología de su secuencia con la secuencia de otras proteínas similares de otros microorganismos.

D07 divulga un método para la síntesis de 4-hidroxi-2,5-dimetil-2,3-dihidrofuran-3-ona mediante la reacción de un alfa-hidroxialdehído o un alfa-cetoaldehído con una alfa-hidroxicetona en presencia de una aldolasa, en concreto la FsaA o la FsaB de Escherichia coli K12.

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

D01 y D02 anticipan un método altamente enantioselectivo para obtener 1-deoxi-L-xilulosa en dos etapas: una primera etapa en la cual se produce la reacción aldólica entre una cetona y un aldehído, en concreto entre hidroxiacetona y benciloxiacetaldehído, catalizada por el anticuerpo 38C2 con actividad aldolasa y en la cual se obtiene la correspondiente alfa,beta-dihidroxicetona (5-o-bencil-1-deoxi-d-xilulosa) y una segunda etapa en la que ésta se somete a hidrogenación en presencia de paladio hidróxido en carbono obteniéndose 1-deoxi-L-xilulosa.

La reacción divulgada, de igual forma que la que es objeto de la presente invención, tiene lugar en dos etapas partiendo de los mismos reactivos, obteniéndose el mismo compuesto intermedio por acción de una aldolasa, ya que la alfa,beta-dihidroxicetona 2alfa es el 5-o-bencil-1-deoxi-d-xilulosa, y además la segunda etapa de la reacción se lleva a cabo en presencia del mismo catalizador. Sin embargo, aunque el producto final obtenido tanto en los documentos mencionados como en la invención que nos ocupa es 1-deoxilulosa, en los documentos D01 y D02 la reacción es altamente enantioselectiva dando lugar a la forma L y no a la forma D de dicha molécula, hecho importante desde el punto de vista químico.

Por otro lado, la fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA) de E. coli, que en la presente invención se utiliza para catalizar la primera etapa de la reacción, es una aldolasa de clase I conocida (D03, D06, D07) que utiliza hidroxiacetona como donador y diferentes aldehídos como aceptores para generar 1-deoxiazúcares, entre ellos glicolaldehído como aceptor para obtener 1-deoxilulosa, no habiéndose encontrado que entre los aldehídos que puede utilizar como aceptores en dicha síntesis química se halle el benciloxiacetaldehído.

Por consiguiente, las reivindicaciones de la 1 a la 7 cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva.