



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 113**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/39** (2006.01)

**C12P 41/00** (2006.01)

**C12P 7/00** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04735228 .1**

96 Fecha de presentación : **28.05.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1633779**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

54 Título: **Oxidorreductasa de *Pichia capsulata*.**

30 Prioridad: **18.06.2003 DE 103 27 454**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.04.2011**

73 Titular/es: **IEP GmbH**  
**Rheingastrasse 190-196**  
**65203 Wiesbaden, DE**

72 Inventor/es: **Zimmer, Anke;**  
**Bobkova, Maria y**  
**Gupta, Antje**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 357 113 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

Oxidorreductasa de *Pichia capsulata*.

5 La presente invención se refiere a una oxidorreductasa, a un procedimiento para la reducción enantioselectiva de compuestos carbonílicos para dar los correspondientes (S)-hidroxicompuestos y a un procedimiento para la obtención del (R)-hidroxicompuesto quiral.

Los hidroxicompuestos ópticamente activos son elementos estructurales quirales valiosos con amplia aplicación para la síntesis de compuestos farmacológicamente eficaces, sustancias aromáticas, feromonas, productos agroquímicos o inhibidores enzimáticos.

10 A este respecto, el número de las carbonilreductasas adecuadas en la biocatálisis y que se encuentran disponibles a buen precio en medida suficiente para aplicaciones a escala industrial es muy limitado. Se conocen las siguientes carbonilreductasas S-específicas dependientes de NADH:

alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH) (Enzyme Engineering, Vol 6, 1982, página 107).

Alcohol deshidrogenasa de levadura (YADH) (Alcohol dehydrogenases: The Enzymes, (1963) páginas 25-83. New York: Academic Press),

15 carbonilreductasa de *Candida parapsilosis* (CPCR) (documentos US 5.523.223 y US 5.763.236),

carbonilreductasa de *Rhodococcus erythropolis* (RECR) (documento US 5.523.223) y *Norcardia fusca* (Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (10) (1999), páginas 1721-1729),

alcohol deshidrogenasa de *Candida boidinii* (Biochim, Biophys. Acta 716, (1982), páginas 298-307) o

alcohol deshidrogenasa de *Sulfolobus solfataricus* (FEMS Microbiology Letters, 170 (1999), páginas 31-39).

20 Ninguna de las carbonilreductasas mencionadas ha encontrado hasta ahora aplicación a escala industrial. El motivo principal de ello es, además de los espectros de sustratos con frecuencia demasiado estrechos o de la enantioselectividad reducida de las enzimas, sobre todo la disponibilidad de estas enzimas. Hasta ahora, la mayoría de las enzimas mencionadas no han podido ponerse a disposición en medida suficiente a precios favorables.

25 Un problema adicional en el caso de la aplicación de las carbonilreductasas mencionadas es la regeneración de los cofactores NADH o NADPH. Los procedimientos conocidos usan o bien regeneración de coenzimas acoplada a sustratos, por ejemplo con 2-propanol, o bien regeneración de coenzimas acoplada a enzimas, por ejemplo con formiato deshidrogenasa.

30 Una desventaja de la regeneración de coenzimas acoplada a enzimas con formiato deshidrogenasa es su baja actividad específica (de 4 a 10 U/mg), por tanto la propia formiato deshidrogenasa recombinante es comparativamente cara (J. Biotechnol. Bioeng. [1999] 64, páginas 187-193).

Una desventaja de la regeneración de coenzimas acoplada a sustratos con isopropanol es la posición del equilibrio desfavorable y la estabilidad enzimática insuficiente con respecto a los cosustratos usados tales como isopropanol.

35 El objetivo de la invención es proporcionar una oxidorreductasa que se caracterice por un amplio espectro de sustratos, alta enantioselectividad y por alta estabilidad frente a disolventes orgánicos.

40 Este objetivo se soluciona mediante una oxidorreductasa que en presencia de NADH y agua reduce un compuesto carbonílico para dar el correspondiente (S)-hidroxicompuesto, en la que más del 70% de los aminoácidos son idénticos a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9 y presenta una actividad específica superior a 1  $\mu$ mol por mg de proteína, con respecto a la reacción de ácido etil-4-cloro-3-oxobutírico para dar ácido (R)-etil-4-cloro-3-hidroxibutírico.

Se ha descubierto ahora que mediante una nueva oxidorreductasa pueden solventarse las desventajas mencionadas de los procedimientos del estado de la técnica.

La invención se refiere, de manera apropiada, a oxidorreductasas que pueden obtenerse a partir de levaduras de los géneros *Pichia* o *Candida*, particularmente a partir de *Pichia capsulata*.

45 En una configuración adicional la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que presenta la secuencia de ADN según la SEQ ID NO:8 y a una oxidorreductasa que presenta la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO:9. Estas secuencias se describen en el protocolo de secuencias adjunto.

Se prefiere una oxidorreductasa en la que del 80% al 99,5%, particularmente del 90% al 99,5%, especialmente del 99% al 99,5% de los aminoácidos sean idénticos a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9. La medición de

la actividad específica de la oxidorreductasa según la SEQ ID NO:9 o de sus derivados o análogos definidos tal como sigue tiene lugar con el sistema de prueba que se describe en el ejemplo 1.

5 La invención se refiere además a la oxidorreductasa, que presenta la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9 y que está modificada una, dos, tres, cuatro o cinco veces mediante un polímero soluble en agua. Un polímero soluble en agua es por ejemplo polietilenglicol. La unión del polietilenglicol tiene lugar preferiblemente en el extremo N-terminal de la proteína según la SEQ ID NO:9. La oxidorreductasa según la SEQ ID NO:9 puede estar unida también a un cuerpo sólido tal como polietileno, poliestireno, polisacárido, celulosa o derivados de celulosa.

10 La invención se refiere también a una proteína de fusión caracterizada porque representa la oxidorreductasa con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9, que está unida con un polipéptido adicional en el extremo N-terminal o carboxilo-terminal a través de un enlace peptídico. Las proteínas de fusión pueden, por ejemplo, separarse más fácilmente de otras proteínas o se expresan en mayor medida en las células.

15 La invención se refiere también a un anticuerpo que se une de manera específica a la oxidorreductasa según la SEQ ID NO:9. La producción de estos anticuerpos tiene lugar según métodos conocidos mediante inmunización de mamíferos adecuados y posterior obtención de los anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales.

La invención se refiere además a una secuencia de ADN aislada que codifica para la oxidorreductasa mencionada anteriormente, seleccionándose la secuencia de ADN del grupo que consiste en:

- 20 a) una secuencia de ADN que presenta la secuencia de nucleótidos según la SEQ ID NO:8 o su cadena complementaria, y  
b) una secuencia de ADN que se hibrida con una secuencia de ADN según a), teniendo lugar la hibridación en condiciones rigurosas.

Las condiciones para la hibridación se describen en Sambrook y Russel, Molecular Cloning a laboratory Manual, Vol 1, capítulo 1, protocolo 30-32.

25 La invención se refiere también a un vector de clonación, que contiene una o varias de las secuencias de ADN o de ácido nucleico mencionadas anteriormente. La invención se refiere también a un vector de expresión que se encuentra en una célula bacteriana, de insecto, vegetal o de mamífero y que contiene una o varias de las secuencias de ADN o de ácido nucleico mencionadas anteriormente, que están unidas de manera adecuada con una secuencia de control de la expresión. La invención se refiere también a una célula huésped que es una célula bacteriana, de levadura, de insecto, vegetal o de mamífero y que se ha transformado o transfectado con un vector de expresión.

30 Las identidades de las secuencias de ADN o secuencia de aminoácidos mencionadas anteriormente se calculan porque se suma el número de los aminoácidos o bases de ácido nucleico que son idénticos a las secuencias parciales de las respectivas proteínas o secuencias de ADN, y se divide la suma entre el número total de los aminoácidos o bases de ácido nucleico y se multiplica por cien.

35 Vectores de clonación adecuados son por ejemplo ppCR-Script, pCMV-Script, pBluescript (Stratagene), vector de clonación pDrive (Quiagen, Hilden, Alemania), pS Blue, pET Blue, vectores pET LIC (Novagen, Madison, EE.UU.) así como vectores de clonación TA-PCR (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania).

Vectores de expresión adecuados son por ejemplo pKK223-3, pTrc99a, pUC, pTZ, pSK, pBluescript, pGEM, pQE, pET, PHUB, pPLc, pKC30, pRM1/pRM9, pTrxFus, pAS1, pGEx, pMAL o pTrx.

40 Secuencias de control de la expresión adecuadas son por ejemplo promotor trp-lac (tac), promotor trp-lac (trc), promotor lac, promotor T7 o promotor  $\square$ pL.

45 La oxidorreductasa de *Pichia capsulata* es un homotetrámero con un peso molecular de  $34 \pm 2$  kDa, determinado en gel de SDS, y un peso molecular de  $140 \pm 10$  kDa, determinado con cromatografía de permeación en gel. El óptimo de temperatura de la oxidorreductasa se encuentra en el intervalo de desde 40°C hasta 45°C, el óptimo de pH para la reacción de reducción se encuentra en el intervalo de desde 6,5 hasta 7,0 y el óptimo de pH para la reacción de oxidación se encuentra en el intervalo de entre 7,8 y 8,2. La oxidorreductasa de *Pichia capsulata* presenta una buena estabilidad frente a la temperatura y frente al pH y es estable en el intervalo de pH de desde 5,5 hasta 8,5 y en el intervalo de temperatura de desde 15°C hasta 40°C durante 5 horas y muestra también una alta estabilidad en disolventes orgánicos.

50 La enzima puede aislarse particularmente de levaduras del género *Pichia* y puede detectarse en una prueba espectrofotométrica a través de la disminución de NADH a 340 nm en presencia de un sustrato correspondiente, por ejemplo 4-cloro-3-oxobutirato de etilo o 2-butanona.

La oxidorreductasa según la invención de *Pichia capsulata* se clonó y pudo sobreexpresarse en *Escherichia coli* (*E. coli*) con actividades de desde 1000 hasta 10.000 U/g de peso húmedo de *E. coli*. La enzima se encuentra

disponible a buen precio y en grandes cantidades. Comparaciones de secuencias en bancos de datos muestran que en el caso de la oxidorreductasa de *Pichia capsulata* según la invención se trata de una carbonilreductasa dependiente de zinc.

5 La invención se refiere también a un procedimiento para la obtención de la oxidorreductasa de *Pichia capsulata*. Para ello se expresa el ADN, que codifica para la oxidorreductasa de *Pichia capsulata*, por ejemplo en un microorganismo procarionta o eucariota adecuado. Preferiblemente, la oxidorreductasa de *Pichia capsulata* se transforma y expresa en una cepa de *E. coli*, particularmente en células BL21star (DE3) de *E. coli*.

10 La oxidorreductasa de *Pichia capsulata* puede obtenerse por ejemplo de modo que se cultivan las células de *E. coli* recombinantes mencionadas anteriormente, se induce la expresión de la oxidorreductasa y a continuación, tras aproximadamente de 10 a 18 horas (h), se abren las células mediante tratamiento con ultrasonidos o mediante molienda en húmedo con perlas de vidrio en un molino de bolas (Retsch, GmbH, Haan, Alemania, 10 min., 24 Hz). El extracto celular obtenido puede o bien usarse directamente o bien purificarse adicionalmente. Para ello, se centrifuga el extracto celular, por ejemplo, y se somete el sobrenadante obtenido a una cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio iónico en un aparato Q-Sepharose Fast Flow® (empresa Pharmacia).

15 La invención se refiere también a un procedimiento para la reducción enantioselectiva de compuestos carbonílicos para dar los correspondientes (S)-hidroxico compuestos, caracterizado porque

- a) se reduce un compuesto carbonílico en presencia de la oxidorreductasa según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, NADH y agua para dar el correspondiente (S)-hidroxico compuesto, y
- b) se aísla el (S)-hidroxico compuesto quiral formado.

20 El procedimiento según la invención presenta un alto tiempo de parada, una pureza enantiomérica superior al 95% de los (S)-hidroxico compuestos quirales producidos y un alto rendimiento con respecto a la cantidad utilizada del compuesto carbonílico.

Por el término "NADH" se entiende nicotinamida adenina dinucleótido reducido.

Por el término "NAD" se entiende nicotinamida adenina dinucleótido.

25 Por la expresión "compuesto carbonílico" se entienden por ejemplo compuestos de fórmula I



El resto R1 representa por ejemplo

- 1) -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), en el que alquilo es lineal o ramificado,
- 30 2) alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), en el que alqueno es lineal o ramificado y según la longitud de cadena contiene uno, dos, tres o cuatro dobles enlaces,
- 3) -alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), en el que alquino es lineal o ramificado y opcionalmente contiene uno, dos, tres o cuatro triples enlaces,
- 4) -arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>),
- 5) -alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>),
- 35 6) -heterociclo (C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>), que no está sustituido o está de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro, o
- 7) -cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>),

en el que los restos mencionados en 1) a 7) no están sustituidos o están mono, bi o trisustituidos, independientemente entre sí, con

- 40 a) -OH,
- b) halógeno, tal como flúor, cloro, bromo o yodo,
- c) -NO<sub>2</sub> o
- d) -NH<sub>2</sub>.

El resto R2 representa por ejemplo

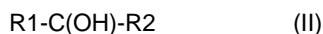
- 45 1) -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que alquilo es lineal o ramificado,

- 2) -alqueno ( $C_2-C_6$ ), en el que alqueno es lineal o ramificado y según la longitud de cadena contiene uno, dos o tres dobles enlaces,
- 3) -alquino ( $C_2-C_6$ ), en el que alquino es lineal o ramificado y opcionalmente contiene uno o dos triples enlaces,
- 5 4) -alquilo ( $C_0-C_{10}$ )-C(O)-O-alquilo ( $C_1-C_6$ ), en el que alquilo es lineal o ramificado y no está sustituido o está de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro,

en el que los restos mencionados en 1) a 4) no están sustituidos o están mono, bi o trisustituidos independientemente entre sí con

- a) -OH,
- 10 b) halógeno, tal como flúor, cloro, bromo o yodo,
- c)  $-NO_2$  o
- d)  $-NH_2$ .

Por la expresión "(S)-hidroxicompuesto" quiral se entienden por ejemplo compuestos de fórmula II



- 15 en la que el grupo OH se encuentra por regla general con configuración (S) con respecto al átomo de carbono al que está unido y R1 y R2 tienen el mismo significado que en la fórmula I.

20 Sin embargo, si cerca del alcohol se encuentra un grupo carbonilo o un átomo de halógeno, se cambia la nomenclatura y los alcoholes enantioselectivos se denominan entonces también (R)-alcoholes. Esto es, sin embargo, sólo una cuestión de nomenclatura, pero no cambia nada en la manera estereoselectiva de cómo la oxidorreductasa según la invención realiza la reducción.

25 Por el término arilo se entienden restos carbonados aromáticos con de 6 a 14 átomos de carbono en el anillo. - Restos arilo ( $C_6-C_{14}$ ) son por ejemplo fenilo, naftilo, 1-naftilo, 2-naftilo, bifenilo, 2-bifenilo, 3-bifenilo y 4-bifenilo, antrilo o fluorenilo. Los restos bifenilo, restos naftilo y particularmente los restos fenilo son restos arilo preferidos. Por el término "halógeno" se entiende un elemento de la serie de flúor, cloro, bromo o yodo. Por la expresión "-alquilo ( $C_1-C_{20}$ )" se entiende un resto hidrocarbonado cuya cadena carbonada es lineal o ramificada y que contiene de 1 a 20 átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonenilo o decanilo. Por la expresión "alquilo  $C_0$ " se entiende un enlace covalente.

Por la expresión "-cicloalquilo ( $C_3-C_7$ )" se entienden restos hidrocarbonados cíclicos tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo.

30 La expresión "-heterociclo ( $C_5-C_{14}$ )" significa un anillo heterocíclico de 5 miembros a 14 miembros monocíclico o bicíclico, que está parcialmente saturado o completamente saturado. Ejemplos de heteroátomos son N, O y S. Ejemplos de la expresión "-heterociclo ( $C_5-C_{14}$ )" son restos que se derivan de pirrol, furano, tiofeno, imidazol, pirazol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, tetrazol, 1,2,3,5-oxatiadiazol-2-óxidos, triazolonas, oxadiazolonas, isoxazolonas, oxadiazolidinonas, triazoles, que están sustituidos con F, -CN,  $-CF_3$  o -C(O)-O-alquilo ( $C_1-C_4$ ), 3-hidroxi-pirrol-2,4-dionas, 5-oxo-1,2,4-tiadiazoles, piridina, pirazina, pirimidina, indol, isoindol, indazol, ftalazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, carbolina y derivados benzocondensados, ciclopenta, ciclohexa o cicloheptacondensados de estos heterociclos. Se prefieren particularmente los restos 2- o 3-pirrolilo, fenilpirrolilo tal como 4- o 5-fenil-2-pirrolilo, 2-furilo, 2-tienilo, 4-imidazolilo, metil-imidazolilo, por ejemplo 1-metil-2-, -4- o -5-imidazolilo, 1,3-tiazol-2-ilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-, 3- o 4-piridil-N-óxido, 2-pirazinilo, 2-, 4- o 5-pirimidinilo, 2-, 3- o 5-indolilo, 2-indolilo sustituido, por ejemplo 1-metil-, 5-metil-, 5-metoxi-, 5-benciloxi-, 5-cloro- o 4,5-dimetil-2-indolilo, 1-bencil-2- o -3-indolilo, 4,5,6,7-tetrahidro-2-indolilo, ciclohepta[b]-5-pirrolilo, 2-, 3- o 4-quinolilo, 1-, 3- o 4-isoquinolilo, 1-oxo-1,2-dihidro-3-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 2-benzofuranilo, 2-benzo-tienilo, 2-benzoxazolilo o benzotiazolilo o dihidropiridinilo, pirrolidinilo, por ejemplo 2- o 3-(N-metilpirrolidinilo), piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tetrahidrotienilo o benzodioxolanilo.

45 Compuestos preferidos de fórmula I son por ejemplo 4-cloroacetoacetato de etilo, acetoacetato de metilo, ácido etil-8-cloro-6-oxooctanoico, 3-oxovalerato de etilo, 4-hidroxi-2-butanona, 2-oxovalerato de etilo, ácido etil-2-oxo-4-fenilbutírico, piruvato de etilo, fenilglicoxilato de etilo, 1-fenil-2-propanona, 2,3-dicloroacetofenona, acetofenona, 2-octanona, 3-octanona o 2-butanona.

50 Los S-alcoholes formados de manera correspondiente son por ejemplo ácido (R)-etil-4-cloro-3-hidroxi-butírico, ácido etil-(S)-2-hidroxi-4-fenilbutírico, (S)-2-octanol o ácido (R)-etil-8-cloro-6-hidroxi-octanoico.

5 Oxidorreductasas adecuadas proceden por ejemplo de *Pichia capsulata*. La oxidoreductasa puede utilizarse en el procedimiento según la invención o bien totalmente purificada o bien parcialmente purificada. El procedimiento se realiza con la oxidoreductasa según la invención o con células que contienen la oxidoreductasa según la invención. A este respecto, las células utilizadas pueden encontrarse de manera nativa, permeabilizadas o lisadas. Preferiblemente se utiliza la oxidoreductasa clonada según la SEQ ID NO:9.

La actividad volumétrica de la oxidoreductasa utilizada asciende a desde 100 unidades/ml (U/ml) hasta 5000 U/ml, de manera preferible a aproximadamente 500 U/ml.

10 Por kg de compuesto que va a hacerse reaccionar de fórmula I se utilizan de 5000 a 2.000.000 U de oxidoreductasa, de manera preferible aproximadamente 10.000-200.000 U. A este respecto la unidad enzimática 1 U corresponde a la cantidad de enzima que se necesita para hacer reaccionar 1  $\mu$ mol del compuesto de fórmula I por minuto (min.).

La invención se refiere también a un procedimiento para la reducción enantioselectiva de compuestos carbonílicos para dar los correspondientes (S)-hidroxicoompuestos, en el que

- 15
- a) se reduce un compuesto carbonílico en presencia de la oxidoreductasa según la invención, NADH y agua para dar el correspondiente (S)-hidroxicoompuesto,
  - b) se reduce el NAD formado mediante la oxidoreductasa con un cosustrato para dar NADH y
  - c) se aísla el (S)-hidroxicoompuesto quiral formado.

20 Las cantidades utilizadas de los compuestos carbonílicos y oxidoreductasas corresponden a las cantidades mencionadas anteriormente en el procedimiento descrito. Cosustratos adecuados para el procedimiento según la invención son alcoholes tales como etanol, 2-propanol (isopropanol), 2-butanol, 2-pentanol o 2-octanol. Estos cosustratos se hacen reaccionar con ayuda de la oxidoreductasa según la invención y NAD para dar las correspondientes cetonas y NADH. De esta manera se produce la regeneración del NADH.

25 La cantidad del cosustrato para la regeneración de NAD para dar NADH tal como isopropanol asciende a desde el 5% hasta el 50% con respecto al volumen total, preferiblemente desde el 8% hasta el 20%, particularmente desde el 10% hasta el 15%.

La invención se refiere además a un procedimiento para la obtención enantioselectiva de (S)-hidroxicoompuestos, en el que

- 30
- a) se reduce un compuesto carbonílico en presencia de la oxidoreductasa según la invención, NADH y agua para dar el correspondiente (S)-hidroxicoompuesto,
  - b) el NAD formado mediante la oxidoreductasa se reduce con una deshidrogenasa y un cosustrato para dar NADH y
  - c) se aísla el (S)-hidroxicoompuesto quiral formado.

35 Deshidrogenasas adecuadas son por ejemplo alcohol deshidrogenasas dependientes de NADH de levadura de panadería, de *Candida boidinii* o *Candida parapsilosis*. Cosustratos adecuados para la alcohol deshidrogenasa utilizada son alcoholes tales como etanol, 2-propanol (isopropanol), 2-butanol, 2-pentanol o 2-octanol.

Además, la reducción de NAD puede realizarse también por medio de formiato deshidrogenasa (Tishkov *et al.*, J. Biotechnol. Bioeng. [1999] 64,187-193, Pilot-scale production and isolation of recombinant NAD and NADP specific formate dehydrogenase). Cosustratos adecuados de la formiato deshidrogenasa son por ejemplo sales del ácido fórmico tales como formiato de amonio, formiato de sodio o formiato de calcio.

40 Preferiblemente se emplea la regeneración de coenzimas acoplada a sustratos con un alcohol secundario tal como etanol, 2-propanol (isopropanol), 2-butanol, 2-pentanol o 2-octanol. Por tanto, el procedimiento se realiza preferiblemente sin una deshidrogenasa adicional.

45 Al agua utilizada en el procedimiento se le añade preferiblemente un tampón, por ejemplo tampón fosfato de potasio, Tris/HCl o trietanolamina con un valor de pH de desde 5 hasta 10, preferiblemente un valor de pH de desde 6 hasta 9. La concentración de tampón asciende a desde 10 mM hasta 150 mM.

El tampón puede contener adicionalmente además iones para la estabilización o activación de las enzimas, por ejemplo iones zinc o iones magnesio.

La temperatura asciende por ejemplo a de 10°C a 60°C, preferiblemente de 30°C a 55°C.

50 La invención se refiere además a un procedimiento para la obtención enantioselectiva de (S)-hidroxicoompuestos, en el que

- a) se reduce un compuesto carbonílico en presencia de la oxidorreductasa, NADH y agua para dar el correspondiente (S)-hidroxicompuesto,
- b) se realizan las reacciones en presencia de un disolvente orgánico y
- c) se aísla el (S)-hidroxicompuesto quiral formado.

5 Los disolventes orgánicos preferidos son por ejemplo dietil éter, terc-butilmetil éter, diisopropil éter, dibutil éter, acetato de butilo, heptano, hexano o ciclohexano.

La mezcla básica de reacción consiste en el caso de la utilización de disolventes adicionales en una fase acuosa y una fase orgánica. La fase orgánica se forma mediante un disolvente adecuado, en el que se encuentra disuelto el sustrato, o mediante el propio sustrato insoluble en agua.

10 A este respecto la fase orgánica asciende a del 5% al 80% del volumen de reacción total, preferiblemente del 10% al 40%.

15 En el sistema de dos fases según la invención el agua forma la primera fase líquida y el disolvente orgánico forma la segunda fase líquida. Opcionalmente pueden existir también una fase sólida o fase líquida adicional más, que se genera por ejemplo mediante la oxidorreductasa no disuelta completamente y/o enzimas introducidas o mediante el compuesto carbonílico. Sin embargo se prefieren dos fases líquidas sin fase sólida. Las dos fases líquidas se mezclan preferiblemente de manera mecánica, de modo que forman grandes superficies entre ambas fases líquidas.

La concentración del cofactor NADH con respecto a la fase acuosa asciende a de 0,01 mM a 1 mM, particularmente de 0,05 mM a 0,2 mM.

20 El compuesto carbonílico se utiliza en el procedimiento según la invención en una cantidad de desde el 3% hasta el 30% con respecto al volumen total, preferiblemente desde el 5% hasta el 15%, particularmente del 10%.

La invención se refiere también a un procedimiento para la reducción enantioselectiva de compuestos carbonílicos para dar los correspondientes (S)-hidroxicompuestos, en el que

- a) se reduce un compuesto carbonílico en presencia de la oxidorreductasa, NADH y agua para dar el correspondiente (S)-hidroxicompuesto,
- 25 b) se realizan las reacciones en presencia de un disolvente orgánico,
- c) el NAD formado mediante la oxidorreductasa se reduce con un cosustrato para dar NADH y
- d) se aísla el (S)-hidroxicompuesto quiral formado.

30 Las cantidades utilizadas de los compuestos carbonílicos y oxidorreductasas corresponden a las del procedimiento mencionado anteriormente. Cosustratos adecuados para el procedimiento son alcoholes tales como etanol, 2-propanol (isopropanol), 2-butanol, 2-pentanol o 2-octanol. Estos cosustratos se hacen reaccionar con ayuda de la oxidorreductasa y NAD para dar las correspondientes cetonas y NADH. De esta manera se produce la regeneración del NADH.

La cantidad del cosustrato tal como isopropanol para la regeneración de NAD para dar NADH asciende a del 5% al 50%, con respecto al volumen total, preferiblemente del 8% al 20% y particularmente del 10% al 15%.

35 La invención se refiere además a un procedimiento para la reducción enantioselectiva de compuestos carbonílicos para dar los correspondientes (S)-hidroxicompuestos, en el que

- a) se reduce un compuesto carbonílico en presencia de la oxidorreductasa, NADH y agua para dar el correspondiente (S)-hidroxicompuesto,
- 40 b) se reduce el NAD formado mediante la oxidorreductasa con una deshidrogenasa y un cosustrato simultáneamente para dar NADH,
- c) se realizan las reacciones en presencia de un disolvente orgánico y
- d) se aísla el (S)-hidroxicompuesto quiral formado.

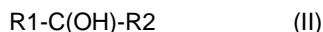
45 En el procedimiento según la invención se utiliza preferiblemente aún un estabilizador adicional de la alcohol deshidrogenasa. Estabilizadores adecuados son por ejemplo glicerina, sorbitol, 1,4-DL-ditiotreitól (DTT) o dimetilsulfóxido (DMSO).

El procedimiento según la invención se realiza por ejemplo en un recipiente de reacción cerrado de vidrio o de metal. Para ello se pasan los componentes individualmente al recipiente de reacción y se agitan bajo una atmósfera de

por ejemplo nitrógeno o aire. Según el sustrato y el compuesto carbonílico utilizado, el tiempo de reacción asciende a de 1 hora a 48 horas, particularmente de 2 horas a 24 horas.

5 A continuación se procesa la mezcla de reacción. Para ello se separa la fase acuosa y se filtra la fase orgánica. La fase acuosa puede extraerse opcionalmente otra vez y procesarse adicionalmente tal como la fase orgánica. Después se evapora opcionalmente el disolvente a partir de la fase orgánica filtrada. De este modo se obtiene el producto ácido (R)-etil-4-cloro-3-hidroxi-butírico con una pureza enantiomérica superior al 99% y esencialmente libre del educto 4-cloroacetato de etilo. El rendimiento total de los procesos asciende tras la destilación del producto a del 50% al 95%, con respecto a la cantidad de educto utilizada.

10 La invención se refiere también a un procedimiento para la obtención de (R)-hidroxicoompuestos quirales de fórmula II,



con los restos R1 y R2 tal como se han definido anteriormente. En el caso de este procedimiento

- 15 a) se incuba una mezcla que contiene el compuesto racémico de fórmula II, con la oxidorreductasa según la invención, NAD y agua y  
 b) se aísla el (R)-hidroxicoompuesto quiral restante de fórmula II.

A este respecto se hace reaccionar el (S)-hidroxicoompuesto de fórmula II para dar el correspondiente cetocompuesto y NADH.

La invención se refiere además a un procedimiento para la obtención de (R)-hidroxicoompuestos quirales de fórmula II, en el que

- 20 a) se incuba una mezcla que contiene el compuesto racémico de fórmula II, con la oxidorreductasa según la invención, NAD y agua,  
 b) se oxida el NADH formado mediante la oxidorreductasa con un cosustrato para dar NAD y  
 c) se aísla el (R)-hidroxicoompuesto quiral restante de fórmula II.

25 La invención se refiere también a un procedimiento para la obtención de (R)-hidroxicoompuestos quirales de fórmula II, en el que

- a) se incuba una mezcla que contiene el compuesto racémico de fórmula II, con la oxidorreductasa según la invención, NAD y agua,  
 b) el NADH formado mediante la oxidorreductasa se oxida con una deshidrogenasa y un cosustrato para dar NAD y  
 30 c) se aísla el (R)-hidroxicoompuesto quiral restante de fórmula II.

En una configuración adicional la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de (R)-hidroxicoompuestos quirales de fórmula II, en el que

- a) se incuba una mezcla que contiene el compuesto racémico de fórmula II, con la oxidorreductasa según la invención, NAD y agua,  
 35 b) se realizan las reacciones en presencia de un disolvente orgánico y  
 c) se aísla el (R)-hidroxicoompuesto quiral restante de fórmula II.

Un procedimiento adicional según la invención para la obtención de (R)-hidroxicoompuestos quirales de fórmula II se caracteriza porque

- 40 a) se incuba una mezcla que contiene el compuesto racémico de fórmula II, con la oxidorreductasa según la invención, NAD y agua,  
 b) se realizan las reacciones en presencia de un disolvente orgánico,  
 c) el NADH formado mediante la oxidorreductasa se oxida con una deshidrogenasa y un cosustrato para dar NAD y  
 d) se aísla el (R)-hidroxicoompuesto quiral restante de fórmula II.



5 Las condiciones de reacción son esencialmente las mismas que en el procedimiento mencionado anteriormente para la reducción enantioespecífica de los cetocompuestos de fórmula I. Sin embargo, en lugar de una reducción enantioselectiva del cetocompuesto de fórmula I a partir de la mezcla racémica del compuesto de fórmula II sólo se oxida el (S)-hidroxicompuesto de fórmula II de manera enantioselectiva para dar el correspondiente cetocompuesto. De esta manera queda el (R)-hidroxicompuesto de fórmula II y puede aislarse.

10 Además, en el procedimiento en lugar de los alcoholes utilizados como cosustratos tales como etanol, 2-propanol (isopropanol), 2-butanol, 2-pentanol o 2-octanol, se utilizan sus cetonas correspondientes tales como acetona para la regeneración del NAD. Por ejemplo, se hace reaccionar la acetona y el NADH con la oxidorreductasa según la invención o una deshidrogenasa adicional para dar NAD e isopropanol. Las cantidades de cetona utilizadas ascienden a desde el 5% hasta el 50% con respecto al volumen total, preferiblemente del 8% al 20% y particularmente desde el 10% hasta el 15%.

La invención se explica a continuación mediante ejemplos.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de levaduras según la alcohol deshidrogenasa S-específica

15 Para la selección se cultivaron una serie de distintas cepas de levadura en el siguiente medio (datos en cada caso en g/l): extracto de levadura (3), extracto de malta (3), peptona (5) y glucosa (10). Se esterilizó el medio a 121°C y se cultivaron las levaduras sin regulación del pH adicional a 25°C y en un agitador a 160 revoluciones por minuto (rpm). A continuación se resuspendieron 125 mg de células con 800 µl de tampón de disgregación (trietanolamina (TEA) 100 mM, pH = 7,0), se mezclaron con 1 g de perlas de vidrio y disgregaron 10 minutos (min.) a 4°C en el molino de bolas (empresa Retsch). El sobrenadante (lisado) obtenido tras 2 min. de centrifugación con 12000 rpm se utilizó en la  
20 siguiente selección de la actividad y para la determinación del exceso enantiomérico (valor de ee). Como sustrato se utilizaron 4-cloroacetoacetato de etilo y 2-cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ona.

Mezcla básica para selección de la actividad:

860 µl de	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 7,0 MgCl <sub>2</sub> 1 mM
20 µl de	NADPH o NADH (10 mM)
20 µl de	lisado
100 µl de	sustrato respectivo (100 mM)

25 La reacción se siguió durante 1 min. a una longitud de onda de 340 nm.

Mezcla básica para la determinación del valor de ee:

20 µl de lisado

100 µl de NADH o NADPH (50 mM)

60 µl de sustrato (4-cloroacetoacetato de etilo 100 mM)

30 Se extrajeron las mezclas básicas para la determinación del ee tras 24 horas (h) con cloroformo y se determinó mediante cromatografía de gases (CG) el exceso enantiomérico.

El exceso enantiomérico se calcula tal como sigue:

$$ee(\%) = ((R\text{-alcohol} - S\text{-alcohol}) / (R\text{-alcohol} + S\text{-alcohol})) \times 100.$$

N.º de DSMZ	Nombre del microorganismo	4-Cloroacetoacetato de etilo			
		Actividad en U/g de células de organismo huésped		Valor de ee	Valor de ee
		NADH	NADPH	NADH	NADPH
1345	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0	15	96% de S	

3434	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	0	6	--	---
3435	<i>Metschnikowia zobelli</i>	0	12	--	--
3795	<i>Kluyveromyces lactis</i>	0	15	80% de S	90% de S
70130	<i>Pichia anomala</i>	0	9	68% de S	90% de S
70169	<i>Pichia membranefaciens</i>	0	8	--	----
70277	<i>Pichia angusta</i>	13	4,5	racemato	30% de S
70382	<i>Pichia pastoris</i>	16	16	64% de S	81% de S
70638	<i>Candida magnoliae</i>	2,5	10	---	80% de R
70125	<i>Candida parapsilosis</i>	25	11	52% de R	70% de S
2147	<i>Pichia methanolica</i>	18	27	84% de S	90% de S
	<i>Candida methylica</i>	8	13	94% de S	94% de S
70260	<i>Pichia capsulata</i>	50	5	100% de R	

DSMZ significa Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, Mascheroder Weg 1 b, 38124 Braunschweig

5 Definición de las unidades enzimáticas: 1 U corresponde a la cantidad de enzima que se necesita para hacer reaccionar 1  $\mu$ mol de sustrato por min.

Ejemplo 2: Aislamiento de una oxidorreductasa (S)-específica dependiente de NADH de *Pichia capsulata*

10 Para el aislamiento de la oxidorreductasa dependiente de NADH de *Pichia capsulata* (*P. capsulata*) se cultivó el microorganismo tal como se describió en el ejemplo 1. Tras alcanzar la fase estacionaria se recogieron las células y se separaron del medio mediante centrifugación. La liberación enzimática tuvo lugar mediante molienda en húmedo por medio de perlas de vidrio, pero también puede lograrse mediante otros métodos de disgregación. Para ello se suspendieron 100 g de *P. capsulata* con 400 ml de tampón de disgregación (trietanolamina 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH =7,0) y se homogeneizaron por medio de una prensa francesa.

El extracto bruto obtenido tras la centrifugación (7000 rpm) se purificó entonces adicionalmente por medio de FPLC (*fast protein liquid chromatography* (cromatografía líquida de proteínas rápida)) y se procesó.

15 La oxidorreductasa según la invención pudo purificarse en dos etapas sucesivas por medio de cromatografía de intercambio iónico con Q-Sepharose Fast Flow (empresa Pharmacia) y Uno Q (Biorad, Múnich, Alemania). Para ello se puso el lisado obtenido tras la centrifugación directamente en una columna Q-Sepharose FF equilibrada con tampón fosfato de potasio 50 mM pH = 7,0 y se eluyó con gradientes de sal lineales crecientes. A este respecto se eluyó la oxidorreductasa con NaCl de 0,2 a 0,3 M. Se reunieron las fracciones que contenían oxidorreductasa y se concentraron por medio de ultrafiltración (límite de corte 10 kDa) hasta un volumen adecuado. A continuación se procesaron adicionalmente las fracciones concentradas de la oxidorreductasa por medio de Uno Q con el uso del mismo tampón mencionado anteriormente y se purificaron. A este respecto se eluyó la enzima con NaCl 0,1 M.

Después se determinó el peso molecular de la oxidorreductasa purificada obtenida con ayuda de permeación en gel (Superdex 200 HR ; Pharmacia, trietanolamina 100 mM, pH = 7, NaCl 0,15 M).

25 Como patrones de peso molecular se usaron catalasa (232 kDa), aldolasa (158 kDa), albúmina (69,8 kDa) y ovoalbúmina (49,4 kDa).

La tabla 2 a continuación resume los resultados obtenidos

Tabla 2

Etapa de purificación	Volumen [ml]	Actividad [U/ml]	Actividad total [U]	Actividad específica [U/mg]	Rendimiento
Extracto bruto	360	2,0	752	0,07	100%
Q-Sepharose	67	5,3	358	5	47%
Uno Q	3,5	14	50	41	6,6%

5 La actividad enzimática de la oxidorreductasa se determinó en el sistema de prueba según el ejemplo 1, (selección de la actividad con mezcla básica) y la determinación de la cantidad de proteína tuvo lugar según Lowry *et al.* Journal of Biological Chemistry, 193 (1951): 265-275 o Peterson *et al.*, Analytical Biochemistry, 100 (1979): 201-220). El cociente de la actividad enzimática con respecto a la cantidad de proteína da como resultado la actividad específica, correspondiendo a la reacción de 1  $\mu$ mol por min. 1 unidad (U).

El peso molecular determinado por medio de permeación en gel de la oxidorreductasa según la invención ascendió en estado nativo a  $140 \pm 10$  kDa.

10 Ejemplo 3: Determinación de la secuencia N-terminal de la oxidorreductasa según la invención

Se separó la preparación enzimática según el ejemplo 2 tras la permeación en gel en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y se transfirió a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (membrana de PVDF).

La banda manifiesta a aproximadamente de 35 a 45 kDa se sometió a una secuenciación N-terminal por medio de degradación de Edman (Procise 492 (PE-Biosystems)). Se obtuvo la siguiente secuencia N-terminal:

15 SEQ ID NO:10

KTQAGYIFKKGGA

Ejemplo 4: Clonación de la oxidorreductasa de *Pichia capsulata*

20 El microorganismo eucariota *Pichia capsulata* pertenece a la familia Saccaromycetacea. La estructura genómica de este organismo presenta una disposición de exón-intrón. Por tanto, para la identificación de la secuencia génica que codifica para la oxidorreductasa enantioselectiva, se preparó una biblioteca de ADNc a partir de las células activas de *Pichia capsulata*.

4.1 Preparación del ARN total de las células de *Pichia capsulata*.

25 Se resuspendieron 600 mg de células nuevas de *Pichia capsulata* en 2,5 ml de tampón LETS helado (Tris-HCl 10 mM, pH = 7,4, EDTA 10 mM, LiCl 100 mM, SDS al 0,2%). A esta suspensión celular se le añadieron 5 ml (aproximadamente 20 g) en perlas de vidrio lavadas con ácido nítrico, que se habían equilibrado con 3 ml de fenol (pH 7,0). Entonces se agitó la mezcla básica total de manera alterna en cada caso 30 segundos (s) (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., Nueva York, EE.UU.) y se enfrió sobre hielo durante 30 s y se trató durante un total de 10 min. A continuación se le añadieron otros 5 ml de tampón LETS helado. Se centrifugó esta suspensión celular durante 5 min. a 11000 g a 4°C. Se retiró la fase acuosa y se extrajo dos veces con el mismo volumen de fenol:cloroformo:3-metil-1-butanol (24:24:1). A continuación tuvo lugar una extracción con cloroformo. Tras la última extracción se precipitó el ARN obtenido total mediante la adición de 1/10 vol. de LiCl 5 M a -20°C durante 4 horas.

Se utilizó 1 mg del ARN aislado para la obtención del ARNm por medio de oligo dT-celulosa (kit de preparación de ARNm, Qiagen).

35 Tras la precipitación posterior se usaron 5  $\mu$ g de ARNm para la síntesis de ADNc (kit de construcción de bibliotecas de ADNc pBluescript IIXR, Stratagene). La biblioteca construida según los datos del fabricante se transformó en XL-10 Gold de *E. coli* y se examinó para determinar la actividad de una (S)-ADH.

40 Mediante la disminución de la extinción con NADH como cofactor y 4-cloroacetoacetato de etilo como sustrato se identificaron y aislaron dos clones (2/1 y 2/2). La secuenciación a través del sitio de clonación múltiple, de los plásmidos contenidos en los clones con el cebador T7 (SEQ ID NO:3) y el cebador T3 (SEQ ID NO:4), dio como resultado un fragmento con un tamaño de 1175 pb (SEQ ID NO:1). Este fragmento codifica para una proteína de fusión con 366 aminoácidos (SEQ ID NO:2) y consiste en el fragmento a de la  $\beta$ -galactosidasa y la secuencia de la oxidorreductasa según la invención.

4.2 Síntesis de un transcrito de longitud completa que codifica para una (S)-ADH de *Pichia capsulata* por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Basándose en la SEQ ID NO:1 se construyeron cebadores específicos para una clonación posterior del transcrito de longitud completa en sistemas de expresión apropiados.

5 A este respecto se modificaron el cebador 5' con una secuencia de reconocimiento para Nde I (o Sph I) y el cebador 3' con una secuencia de reconocimiento para Hind III (SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7)

Oligonucleótido 1-Nde I: 5'-GGAATTCCATATGTCTGCTCTCTCCAAAAC-3'

Oligonucleótido 2-Sph I: 5'-CACTGCATGCTGATGTCTGCTCTCTCCAAAAC-3'

Oligonucleótido 3-Hind III: 5'-CCCAAGCTTTCATGGAAGCATAACCAATCTT-3'

10 El ADN de plásmido aislado a partir del clon 2/1 de la biblioteca de expresión de *Pichia capsulata* sirvió como matriz para la reacción en cadena de la polimerasa. La amplificación se realizó en un tampón para PCR [Tris-HCl 10 mM, (pH 8,0); KCl 50 mM; MgSO<sub>4</sub> 10 mM; mezcla de dNTP 1 mM (a este respecto N significa las bases A, T, C o G); por 30 pmoles de cebador y 2,5 U de ADN-polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen)] con 50 ng de molde y los siguientes ciclos de temperatura:

15

Ciclo 1:	94°C, 2 min.
Ciclo 2 x 30:	94°C, 15 s
	58°C, 30 s
	68°C, 75 s
Ciclo 3:	68°C, 7 min.
	4°C, ∞

20 El producto de PCR resultante se digirió tras la purificación mediante un gel de agarosa al 1% con ayuda de las endonucleasas Nde I e Hind III, o con las endonucleasas Sph I e Hind III, y se ligó en la estructura principal tratada con las mismas endonucleasas del vector pET21a (Novagen), o vector pQE30 (Qiagen). Tras la transformación de 2 µl de la mezcla básica de ligación en células Top 10 F' de *E. coli* (Invitrogen) se sometieron a prueba los ADN de plásmido de colonias resistentes a ampicilina por medio de un análisis de restricción con las endonucleasas Nde I e Hind III o las endonucleasas Sph I e Hind III para detectar la presencia de un inserto con un tamaño de 1100 pb. Se secuenció el constructo de expresión pET21-PC n.º 10. El transcrito que codifica para la oxidorreductasa según la invención de *Pichia capsulata* presenta un marco de lectura abierto de 1026 pb en total (SEQ ID NO:8), que corresponde a una proteína de 341 aminoácidos (SEQ ID NO:9)

25

4.3 Expresión de la oxidorreductasa según la invención de *P. capsulata* en células Star BL 21 (De3) de *E. coli*

Se transformaron células competentes StarBL21 (De3) de *Escherichia coli* (Invitrogen) con el constructo de expresión que codifica para la oxidorreductasa según la invención pET21-PC n.º10.

30

Se cultivó la cepa transformada en medio LB (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%) con ampicilina (50 µg/ml), hasta que se alcanzó una densidad óptica, medida a 500 nm, de 0,5. La producción de la proteína oxidorreductasa recombinante se inició mediante la adición de isopropiltiogalactósido (IPTG) en una concentración final de 1 mM. Se incubó la mezcla básica de inducción durante otras 15 h a 25°C y 220 rpm.

La actividad enzimática alcanzada ascendió a aproximadamente 6000 U/g de masa húmeda celular.

4.4 Expresión de la oxidorreductasa según la invención de *P. capsulata* en células RB791 de *E. coli*

35

Se transformaron células competentes RB791 de *Escherichia coli* con el constructo de expresión pQE30-PC n.º 12 para la oxidorreductasa según la invención.

40

Se cultivó la cepa transformada en medio LB (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%) con ampicilina (50 µg/ml), hasta que se alcanzó una densidad óptica, medida a 500 nm, de 0,5. La producción de la proteína oxidorreductasa recombinante se inició mediante la adición de IPTG en una concentración final de 0,1 mM. Se incubó la mezcla básica de inducción durante otras 15 horas a 25°C y 220 rpm. La actividad enzimática alcanzada ascendió a aproximadamente 1000 U/g de masa húmeda celular.

Ejemplo 5: Caracterización de la oxidorreductasa recombinante de *P. capsulata*

5.1 Óptimo de pH

Se produjeron los tampones expuestos en la tabla 3. La concentración de los componentes de tampón respectivos ascendió en cada caso a 50 mM.

5 Tabla 3

Valor de pH	Sistema tampón	Valor de pH	Sistema tampón
4	acetato de Na/ácido acético	7,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
4,5	acetato de Na/ácido acético	8	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5	acetato de Na/ácido acético	8,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9	glicina/NaOH
6	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,5	glicina/NaOH
6,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	glicina/NaOH
7	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11	glicina/NaOH

Mezcla básica de medición (30°C):

- 870  $\mu$ l de los sistemas tampón mencionados en cada caso en la tabla 3
- 20  $\mu$ l de NADH 10 mM (8,6 mg/ml de agua)
- 10  $\mu$ l de enzima diluida

- 10 Se incubó aproximadamente de 2 a 3 min., después tuvo lugar la adición de  
 100  $\mu$ l de disolución de sustrato (ácido etil-4-cloro-3-oxobutírico 100 mM)

- 15 Para la determinación del óptimo de pH se determinó la reacción enzimática en el respectivo tampón expuesto en la tabla 3. Para la determinación del óptimo de pH para la reacción de oxidación se utilizó como cofactor NADH y como sustrato ácido (S)-metil-3-hidroxibutírico. A este respecto pudo calcularse para la enzima según la invención un óptimo de pH de desde 6,5 hasta 7 para la reacción de reducción y desde 7,8 hasta 8,2 para la reacción de oxidación.

5.2 Estabilidad con respecto al pH

- 20 La determinación de la actividad de la oxidorreductasa recombinante se examinó mediante almacenamiento en los sistemas tampón mencionados en la tabla 3. Para ello se prepararon los distintos tampones (50 mM) en el intervalo de desde pH 4 hasta 11 y se diluyó con los mismos la oxidorreductasa producida según el ejemplo 4. Tras 30, 60 y 300 min. de incubación se retiraron 10  $\mu$ l de la mezcla básica y se usaron en la prueba de actividad según el ejemplo 1.

A este respecto, el valor inicial es el valor de medición que se obtuvo inmediatamente tras diluir (1:20) la enzima en tampón fosfato de potasio 50 mM pH = 7,0. Este valor correspondía en las condiciones dadas a una variación de la extinción de aproximadamente 0,70/min. y se fijó como el valor del 100% y todos los valores de medición siguientes se fijaron en relación a este valor .

- 25 A este respecto se comprobó que la oxidorreductasa recombinante de *P. capsulata* es estable a un pH de desde 5,5 hasta 8,5 y puede incubarse durante al menos 5 h sin pérdida esencial de actividad. Incubaciones a valores de pH por encima de 9,0 y por debajo de 5,0 condujeron a una desactivación inmediata de la enzima.

5.3 Óptimo de temperatura

Para la determinación de la temperatura de prueba óptima se midió la actividad enzimática en el intervalo de temperatura de desde 15°C hasta 70°C en la mezcla básica de medición patrón. Tal como resulta evidente a partir de la tabla 4, la enzima tiene su máxima actividad a 45°C, a continuación la actividad disminuye rápidamente.

Tabla 4

Temperatura (°C)	Actividad en U/ml de enzima no diluida	Temperatura (°C)	Actividad en U/ml de enzima no diluida
15	73	45	176
20	83	50	122
25	128	55	45
30	135	60	0
35	163	65	0
40	170	70	0

5

#### 5.4 Estabilidad con respecto a la temperatura

De manera análoga a la descrita en el ejemplo 5.2 se determinó la estabilidad con respecto a la temperatura para el intervalo de desde 15°C hasta 70°C. Para ello se incubó en cada caso una dilución 1:20 de la oxidorreductasa purificada durante 60 min. y 180 min. a la temperatura respectiva y a continuación se midió a 30°C con la mezcla básica de prueba anterior. También en este caso se consideró como valor inicial el valor de medición que se obtiene inmediatamente tras la dilución de la oxidorreductasa purificada en tampón fosfato de potasio 50 mM a pH = 7,0. Este valor se fijó también en este ejemplo como el valor del 100%.

10

A este respecto la enzima es completamente estable en un intervalo de temperatura de desde 15°C hasta 40°C y no muestra tras 3 h de incubación ninguna pérdida de actividad. A 55°C, tras 30 min. ya no puede detectarse ninguna actividad enzimática.

15

#### 5.5 Espectro de sustratos/exceso enantiomérico

El espectro de sustratos de la oxidorreductasa según la invención se determinó mediante la medición de la actividad enzimática con una serie de cetonas, oxoácidos y sus ésteres. Para ello se usó la mezcla básica de medición patrón según el ejemplo 5.1 con sustratos diferentes. La actividad con 4-cloroacetoacetato de etilo se fijó como igual al 100% y todos los demás sustratos se fijaron en relación a ello.

20

Para la determinación del valor de ee se usaron para los sustratos seleccionados la siguiente mezcla básica de reacción.

100  $\mu$ l de NADH (50 mM)

60  $\mu$ l de sustrato (100 mM)

25 + de 1 a 2 U de la oxidorreductasa según la invención

Las mezclas básicas para la determinación del ee se extrajeron con cloroformo tras 24 h y se determinó por medio de CG el exceso enantiomérico del alcohol resultante.

Tabla 5

Sustrato	Actividad relativa %	Estereo-selectividad	Sustrato	Actividad relativa %	Estereo-selectividad
Cetonas			Éster de 3-oxoácido		
1-fenil-2-propanona	24	97% de S	4-Cloroacetoacetato de etilo	100	99% de R

2-cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ona	21	100% de R	Acetoacetato de metilo	150	97% de S
Acetofenona	4	n.d.	Ácido etil-8-cloro-6-oxooctanoico	20	100% de R
Caprilofenona	0	n.d.	Ácido dimetil-3-oxo-1,8-octanodioico	3,5	n.d.
2-Octanona	88	100% de S	3-Oxovaleriato de etilo	67	n.d.
3-Octanona	30	n.d.	Acetoacetato de etilo	100	99% de S
2-Butanona	99	50% de S			
4-Hidroxi-2-butanona	99	90% de S			
2-Oxovaleriato de etilo	41	97% de S	Ácido 2-oxovaleriánico	0	n.d.
Ácido etil-2-oxo-4-fenilbutírico	76	95% de S	Ácido 2-oxo-3-fenilpropiónico	0	n.d.
Piruvato de etilo	10	100% de S	Ácido 2-oxobutírico	0	n.d.
Fenilgloxilato de etilo	5,2	100% de R			

n.d. significa no determinado

Tal como resulta evidente a partir de la tabla 5, a partir de la oxidorreductasa según la invención se reducen de manera estereoselectiva un amplio espectro de ésteres de 2- y 3-oxoácidos tales como cetonas aromáticas y alifáticas.

#### 5.5 Estabilidad con respecto al disolvente

5 Se examinó la estabilidad enzimática de la oxidorreductasa de *P. capsulata* en presencia de disolventes orgánicos. Para ello se diluyó la oxidorreductasa en cada caso 1:20 con las mezclas de disolventes indicadas (en el caso de disolventes orgánicos miscibles con agua) y se incubó a temperatura ambiente (de 20°C a 24°C; TA). A continuación se añadieron 10  $\mu$ l de la disolución enzimática en la mezcla básica de prueba patrón. También en este caso se fijó el valor inicial tras la dilución en el tampón (tampón fosfato de potasio (KPP, *Kaliumphosphatpuffer*) 100 mM, pH = 7,0) como igual al 100% y todos los demás valores se fijaron en relación a éste.

10 En el caso de los disolventes orgánicos no miscibles con agua la dilución también tuvo lugar en tampón fosfato de potasio, se añadió el mismo volumen de disolvente orgánico a la mezcla básica y se incubó la mezcla básica a TA en un aparato Thermomixer con 170 rpm. La medición de la actividad tuvo lugar en la fase acuosa. La tabla 6 muestra los resultados.

#### 15 Tabla 6

Actividad	8 h	24 h	Actividad	8 h	24 h
Tampón	100%	100%	Acetato de etilo	2	0
KPP 100 mM pH =7					
MgCl <sub>2</sub> 1 mM					
Isopropanol al 5%	77%	77%	Acetato de butilo	53%	28%
Isopropanol al 10%	72%	72%	Dietil éter	100%	100%
Isopropanol al 20%	46%	46%	Metil-terc-butil éter	100%	100%

Isopropanol al 30%	18%	18%	Diisopropil éter	100%	100%
EtOH al 5%	77%	77%	Cloroformo	51%	0%
EtOH al 10%	77%	77%	Hexano	60%	20%
EtOH al 20%	100%	100%	Heptano	74%	43%
EtOH al 30%	64%	64%	Ciclohexano	85%	70%
DSMO al 10%	42%	45%			
DSMO al 20%	30%	30%			

EtOH significa etanol; DSMO significa dimetilsulfóxido

5 Tal como resulta evidente a partir de la tabla 6, la oxidoreductasa de *P. capsulata* muestra una actividad sorprendente frente a disolventes orgánicos. En contra de la doctrina habitual la oxidoreductasa según la invención se estabiliza incluso en disolventes orgánicos miscibles con agua, así como no miscibles con agua en comparación con la incubación en tampón puro. Por tanto, la oxidoreductasa según la invención puede utilizarse en un sistema de dos fases, tal como se describe en el documento 101 19274 A1.

### 5.7 Reacciones preparativas

#### 5.7.1 Reducción de 4-cloroacetoacetato de etilo para dar ácido etil-(R)-4-cloro-3-hidroxi-butírico

10 Para la mezcla básica preparativa se incubó una mezcla de 34 l de tampón (TEA 100 mM, pH = 7, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM, glicerina al 10%), 4 l de isopropanol, 4 l de 4-cloroacetoacetato, 4 g de NAD y 3,6 millones de U de oxidoreductasa recombinante de *Pichia capsulata* durante 24 h a temperatura ambiente con mezclado continuo. Tras 24 h se había reducido el 99% del 4-cloroacetoacetato utilizado. A continuación se extrajo la mezcla de reacción con acetato de etilo, se eliminó el disolvente por medio de evaporador rotatorio y se destiló el producto bruto. De esta manera se obtuvieron 15 2,8 l (3,4 kg) de ácido etil-(R)-4-cloro-3-hidroxi-butírico con un exceso enantiomérico del 99%. Esto corresponde a un rendimiento del 70% con respecto a la cantidad de educto utilizada.

#### 5.7.2. Reducción de 2-cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ona para dar (R)-2-cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ol

20 Para la mezcla básica preparativa se incubó una mezcla de 164 ml de tampón (TEA 100 mM, pH = 7, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM, glicerina al 20%) 16 ml de isopropanol, 20 g de 2-cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ona disueltos en 20 ml de metil-terc-butil éter (MTBE), 10 mg de NAD y 20.000 U de oxidoreductasa recombinante de *Pichia capsulata* durante 24 h a temperatura ambiente con mezclado continuo. Tras 24 h, se había reducido el 96% de la 2-cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ona utilizada. A continuación se extrajo la mezcla de reacción con acetato de etilo y se eliminó el disolvente con el evaporador rotatorio. De esta manera se obtuvieron 15 g de (R)-2-cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ol con un exceso enantiomérico del 100%. Esto corresponde a un rendimiento del 77% con respecto a la cantidad de educto utilizada.



## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Juelich Enzyme Products GmbH<120> Oxidorreductasa de Pichia capsulata<130> (TH)4090<160> 10<170> PatentIn versión 3.1<210> 1<211> 1175<212> ADN<213> Pichia capsulata<400> 1

5

cgcggtggcg gccgctctag aactagtgga tccccgggc tgcaggaatt cggcacgagg 60

atcttctca actacaatgt ctgctctc caaaaccag gccggtaca tctcaagaa 120

10

gggtgccgt cacatgta aggccgaggt tccaatccc aagccaactg gtgccaatc 180

tcttctagg gtcaaggctg caggaatgt ccactctgac ttgcacgta ttgagaaac 240

attggagtc cctaccgatg ggtacgtct cgtcacgaa attgctggtg aattggtgga 300

15

gatcggagac tcggtcaacc ctgaagttt taagtgga ggccgttatg ctgtcatgg 360

actgaattcg tgtgatcct gtgagatgt tctaccggt catgacaatg actgtactgg 420

20

aatgaatcg aatggtacg gtctgggaat tagtggtgtg taccagcagt acctgctggt 480

gcaaattcg caccatctat tgctattcc agataacgtg tctacgaag ttctgctgc 540

cacctgat gctgttga ctccatcca tgctatcaag aattccggag tgactccatc 600

25

ttctaagggt ttgatgttg gtctgggtg tttgggatcg aacgcactc agatcctcaa 660

ggcattgga gcctatggt ttgccgtga tgcaagccc gcatcaaag caattgccga 720

30

cgaattcaaa gcggatgaat tctataccga tatcagcaa tcttctgga aaccagcctc 780

gttgattac gttttgact tcttctgct gcagtcacc ttcgacatct gccagaagta 840

tatcaagtcc cacggtacca tctcccagt ggtctgggc tcgagcaagc tgacttcca 900

35

cttgggaaac ctggcattgc gtgaagtaaa aattgttgt aactctggg gtacttctca 960

# ES 2 357 113 T3

ggaacagatc gaagcaatgg agctggtagg ctcgggtagg gtcaagcctc aagttcacac 1020

caccgaactt gaaaaccttc ctgaatcact tgaaaaactg gaggagggta agatcaatgg 1080

5 aagattgggt atgcttccat gatcacaac tattataac gagatcagag aaaaagtta 1140

atatgatgtc gttttccaa tcaaaagggg ggccc 1175

10 <210> 2<211> 366<212> PRT<213> Artificial<400> 2

Ala Val Ala Ala Ala Leu Glu Leu Val Asp Pro Pro Gly Cys Arg Asn

1 5 10 15

15

Ser Ala Arg Gly Ser Phe Ser Thr Thr Met Ser Ala Leu Ser Lys Thr

20 25 30

20 Gln Ala Gly Tyr Ile Phe Lys Lys Gly Ala Gly His Ile Val Lys Ala

35 40 45

Glu Val Pro Ile Pro Lys Pro Thr Gly Ala Gln Ser Leu Leu Arg Val

25 50 55 60

Lys Ala Ala Gly Met Cys His Ser Asp Leu His Val Ile Gly Glu Thr

65 70 75 80

30

Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Tyr Val Leu Gly His Glu Ile Ala Gly

85 90 95

35

Glu Leu Val Glu Ile Gly Asp Ser Val Asn Pro Glu Val Phe Lys Val

100 105 110

Gly Gly Arg Tyr Ala Val His Gly Leu Asn Ser Cys Gly Ser Cys Glu

5 115 120 125

Met Cys Arg Thr Gly His Asp Asn Asp Cys Thr Gly Asn Glu Ser Lys

130 135 140

10

Trp Tyr Gly Leu Gly Ile Ser Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Leu Leu Val

145 150 155 160

15

Pro Asn Ser His His Leu Leu Pro Ile Pro Asp Asn Val Ser Tyr Glu

165 170 175

20 Val Ala Ala Ala Thr Ser Asp Ala Val Leu Thr Pro Tyr His Ala Ile

180 185 190

Lys Asn Ser Gly Val Thr Pro Ser Ser Lys Val Leu Met Phe Gly Leu

25 195 200 205

Gly Gly Leu Gly Ser Asn Ala Leu Gln Ile Leu Lys Ala Phe Gly Ala

210 215 220

30

Tyr Val Val Ala Val Asp Val Lys Pro Ala Ser Lys Ala Ile Ala Asp

225 230 235 240

35

Glu Phe Lys Ala Asp Glu Phe Tyr Thr Asp Ile Ser Gln Ser Ser Trp

245 250 255

Lys Pro Ala Ser Phe Asp Tyr Cys Phe Asp Phe Val Ser Leu Gln Val

5 260 265 270

Thr Phe Asp Ile Cys Gln Lys Tyr Ile Lys Ser His Gly Thr Ile Phe

275 280 285

10

Pro Val Gly Leu Gly Ser Ser Lys Leu Thr Phe Asp Leu Gly Asn Leu

290 295 300

15

Ala Leu Arg Glu Val Lys Ile Val Gly Asn Phe Trp Gly Thr Ser Gln

305 310 315 320

20 Glu Gln Ile Glu Ala Met Glu Leu Val Ser Ser Gly Arg Val Lys Pro

325 330 335

Gln Val His Thr Thr Glu Leu Glu Asn Leu Pro Glu Ser Leu Glu Lys

25 340 345 350

Leu Glu Glu Gly Lys Ile Asn Gly Arg Leu Val Met Leu Pro

355 360 365

30

<210> 3<211> 17<212> ADN<213> Artificial<400> 3

gtaatacgcac tataggg 17

35

<210> 4<211> 21<212> ADN<213> Artificial<400> 4

caattaaccc tactaaagg g 21

<210> 5<211> 30<212> ADN<213> Artificial<400> 5  
5 ggaattccat atgtctgctc tctccaaaac 30

<210> 6<211> 32<212> ADN<213> Artificial<400> 6  
10 cactgcatgc tgatgtctgc tctctccaaa ac 32

<210> 7<211> 31<212> ADN<213> Artificial<400> 7  
15 cccaagcttt catggaagca taaccaatct t 31

<210> 8<211> 1026<212> ADN<213> *Pichia capsulata*<400> 8  
20 atgtctgctc tctccaaaac ccaggccggt tacatctca agaagggtgc cggtcacatc 60

gtcaaggccg aggtccaat cccaagcca actggtgcc aatctctct taggtcaag 120  
20 gctgcaggaa tgtccactc tgactgcac gtcattggag aaacattgga ggtccctacc 180

gatgggtacg tgctcggta cgaaattgct ggtgaattgg tggagatcgg agactcggtc 240

25 aaccctgaag ttttaaggt gggaggccgt tatgctgttc atggactgaa ttcgtgtgga 300

tcctgtgaga tgtgtctac cggtcatgac aatgactgta ctggaaatga atcgaaatgg 360

tacggctgg gaattagtgg tggttaccag cagtacctgc tgggccaata ttcgcacat 420  
30 ctattgccta ttccagataa cgtgcctac gaagttgctg ctgccacctc tgatgtctc 480

ttgactccat accatgctat caagaattcc ggagtgactc catcttctaa ggtgttgatg 540

35 ttggtctgg gtggttggg atcgaacgca ctcagatcc tcaaggcatt tggagcctat 600

gtggtgccc ttgatgcaa gcccgcatcc aaagcaattg cgcacgaatt caaagcggat 660

gaattctata ccgatatcag ccaatcttct tggaaaccag cctcgtttga ttactgtttt 720

5 gacttcgttt cgctgcaggt caccttcgac atctgccaga agtatatcaa gtcccacggt 780

accatcttcc cagtgggtct gggctcgagc aagctgactt tcgactggg aaacctggca 840

ttcgtgaag taaaaattgt tgtaacttc tgggtactt ctcaggaaca gatcgaagca 900

10

atggagctgg ttagctcggg taggtcaag cctcaagttc acaccaccga actgaaaac 960

cttctgaat cactgaaaa actggaggag ggtaagatca atggaagatt ggtatgctt 1020

15 ccatga 1026

<210> 9<211> 341<212> PRT<213> *Pichia capsulata*<400> 9

20 Met Ser Ala Leu Ser Lys Thr Gln Ala Gly Tyr Ile Phe Lys Lys Gly

1 5 10 15

Ala Gly His Ile Val Lys Ala Glu Val Pro Ile Pro Lys Pro Thr Gly

25 20 25 30

Ala Gln Ser Leu Leu Arg Val Lys Ala Ala Gly Met Cys His Ser Asp

35 40 45

30

Leu His Val Ile Gly Glu Thr Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Tyr Val

50 55 60

35

Leu Gly His Glu Ile Ala Gly Glu Leu Val Glu Ile Gly Asp Ser Val

65            70            75            80

Asn Pro Glu Val Phe Lys Val Gly Gly Arg Tyr Ala Val His Gly Leu

5            85            90            95

Asn Ser Cys Gly Ser Cys Glu Met Cys Arg Thr Gly His Asp Asn Asp

100            105            110

10

Cys Thr Gly Asn Glu Ser Lys Trp Tyr Gly Leu Gly Ile Ser Gly Gly

115            120            125

15

Tyr Gln Gln Tyr Leu Leu Val Pro Asn Ser His His Leu Leu Pro Ile

130            135            140

20 Pro Asp Asn Val Ser Tyr Glu Val Ala Ala Ala Thr Ser Asp Ala Val

145            150            155            160

Leu Thr Pro Tyr His Ala Ile Lys Asn Ser Gly Val Thr Pro Ser Ser

25            165            170            175

Lys Val Leu Met Phe Gly Leu Gly Gly Leu Gly Ser Asn Ala Leu Gln

180            185            190

30

Ile Leu Lys Ala Phe Gly Ala Tyr Val Val Ala Val Asp Val Lys Pro

195            200            205

35

Ala Ser Lys Ala Ile Ala Asp Glu Phe Lys Ala Asp Glu Phe Tyr Thr

ES 2 357 113 T3

210            215            220

Asp Ile Ser Gln Ser Ser Trp Lys Pro Ala Ser Phe Asp Tyr Cys Phe

5    225            230            235            240

Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Thr Phe Asp Ile Cys Gln Lys Tyr Ile

245            250            255

10

Lys Ser His Gly Thr Ile Phe Pro Val Gly Leu Gly Ser Ser Lys Leu

260            265            270

15

Thr Phe Asp Leu Gly Asn Leu Ala Leu Arg Glu Val Lys Ile Val Gly

275            280            285

20    Asn Phe Trp Gly Thr Ser Gln Glu Gln Ile Glu Ala Met Glu Leu Val

290            295            300

Ser Ser Gly Arg Val Lys Pro Gln Val His Thr Thr Glu Leu Glu Asn

25    305            310            315            320

Leu Pro Glu Ser Leu Glu Lys Leu Glu Glu Gly Lys Ile Asn Gly Arg

325            330            335

30

Leu Val Met Leu Pro

340

35

<210> 10<211> 12<212> PRT<213> *Pichia capsulata*<400> 10



Lys Thr Gln Ala Gly Tyr Ile Phe Lys Lys Gly Ala

1            5            10

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Oxidorreductasa, que en presencia de NADH y agua reduce un compuesto carbonílico para dar el correspondiente (S)-hidroxicompuesto, caracterizada porque más del 70% de los aminoácidos son idénticos a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9 y presenta una actividad específica superior a 1  $\mu$ mol por mg de proteína, con respecto a la reacción de ácido etil-4-cloro-3-oxobutírico para dar ácido (R)-etil-4-cloro-3-hidroxibutírico.
2. Oxidorreductasa según la reivindicación 1, caracterizada porque del 80% al 99,5%, particularmente del 90% al 99,5%, especialmente del 99% al 99,5% de los aminoácidos son idénticos a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9.
- 10 3. Oxidorreductasa según la reivindicación 2, caracterizada porque presenta la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO:8 y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9.
4. Oxidorreductasa según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque presenta la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9 y está modificada una, dos, tres, cuatro o cinco veces mediante un polímero soluble en agua.
- 15 5. Oxidorreductasa según la reivindicación 4, caracterizada porque el polímero soluble en agua es polietilenglicol.
6. Oxidorreductasa según la reivindicación 3, caracterizada porque la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9 está unida con un polipéptido adicional en el extremo N-terminal o carboxilo-terminal a través de un enlace peptídico.
7. Anticuerpo, caracterizado porque se une de manera específica a la oxidoreductasa según la SEQ ID NO:9.
- 20 8. Secuencia de ácido nucleico aislada, que codifica para una oxidoreductasa según la reivindicación 1, seleccionándose la secuencia de ácido nucleico del grupo que consiste en:
- a) una secuencia de ácido nucleico que presenta la SEQ ID NO:8, o su cadena complementaria, y
- b) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia según (a) en condiciones rigurosas.
- 25 9. Vector de clonación, caracterizado porque presenta una o varias de las secuencias de ácido nucleico o de ADN según la reivindicación 8.
10. Vector de expresión, caracterizado porque contiene una o varias de las secuencias de ácido nucleico o de ADN según la reivindicación 8 y está unido de manera adecuada con una secuencia de control de la expresión.
- 30 11. Célula huésped que es célula bacteriana, de levadura, de insecto, vegetal o de mamífero y que se ha transformado o transfectado con un vector de expresión según la reivindicación 10.
12. Procedimiento para la reducción enantioselectiva de compuestos carbonílicos para dar los correspondientes (S)-hidroxicompuestos, caracterizado porque
- a) un compuesto carbonílico en presencia de la oxidoreductasa según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, NADH y agua se reduce para dar el correspondiente (S)-hidroxicompuesto y
- 35 b) se aísla el (S)-hidroxicompuesto quiral formado.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque como compuesto carbonílico se utiliza un compuesto de fórmula I
- $$\text{R1-C(O)-R2} \quad (\text{I})$$
- con un resto R1 de
- 40 1) -alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ ), en el que alquilo es lineal o ramificado,
- 2) -alqueno ( $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ ), en el que alqueno es lineal o ramificado y según la longitud de cadena contiene uno, dos, tres o cuatro dobles enlaces,
- 3) -alquino ( $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ ), en el que alquino es lineal o ramificado y opcionalmente contiene uno, dos, tres o cuatro triples enlaces,
- 45 4) -arilo ( $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ ),
- 5) -alquil ( $\text{C}_1\text{-C}_8$ )-arilo ( $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ ),

- 6) -heterociclo (C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>), que no está sustituido o está de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro, o
- 7) -cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>);
- 5 en el que los restos R1 mencionados en 1) a 7) no están sustituidos o están mono, bi o trisustituidos, independientemente entre sí, con
- a) -OH,
- b) halógeno, tal como flúor, cloro, bromo o yodo,
- c) -NO<sub>2</sub> o
- d) -NH<sub>2</sub> y
- 10 con un resto R2 de
- 1) -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que alquilo es lineal o ramificado,
- 2) -alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), en el que alqueno es lineal o ramificado y según la longitud de cadena contiene uno, dos o tres dobles enlaces,
- 15 3) -alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), en el que alquino es lineal o ramificado y contiene opcionalmente uno o dos triples enlaces, o
- 4) -alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>10</sub>)-C(O)-O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que alquilo es lineal o ramificado y no está sustituido o está de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro,
- en el que los restos R2 mencionados en 1) a 4) no están sustituidos o están mono, bi o trisustituidos, independientemente entre sí con
- 20 a) -OH,
- b) halógeno, tal como flúor, cloro, bromo o yodo,
- c) -NO<sub>2</sub> o
- d) -NH<sub>2</sub>.
14. Procedimiento según la reivindicación 12 ó 13, caracterizado porque
- 25 a) se reduce un compuesto carbonílico en presencia de la oxidoreductasa según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, NADH y agua para dar el correspondiente (S)-hidroxicompuesto,
- b) el NAD formado mediante la oxidoreductasa se reduce con un cosustrato para dar NADH y
- c) se aísla el (S)-hidroxicompuesto quiral formado.
15. Procedimiento según la reivindicación 12 ó 13, caracterizado porque
- 30 a) se reduce un compuesto carbonílico en presencia de la oxidoreductasa según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, NADH y agua para dar el correspondiente (S)-hidroxicompuesto,
- b) el NAD formado mediante la oxidoreductasa se reduce con una deshidrogenasa y un cosustrato para dar NADH y
- c) se aísla el (S)-hidroxicompuesto quiral formado.
- 35 16. Procedimiento según la reivindicación 12 ó 13, caracterizado porque
- a) se reduce un compuesto carbonílico en presencia de la oxidoreductasa según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, NADH y agua para dar el correspondiente (S)-hidroxicompuesto,
- b) se realizan las reacciones en presencia de un disolvente orgánico y
- c) se aísla el (S)-hidroxicompuesto quiral formado.
- 40 17. Procedimiento según la reivindicación 12 ó 13, caracterizado porque

- a) se reduce un compuesto carbonílico en presencia de la oxidorreductasa según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, NADH y agua para dar el correspondiente (S)-hidroxicompuesto,
- b) se realizan las reacciones en presencia de un disolvente orgánico,
- c) el NAD formado mediante la oxidorreductasa se reduce con un cosustrato para dar NADH, y
- 5 d) se aísla el (S)-hidroxicompuesto quiral formado.
18. Procedimiento según la reivindicación 12 ó 13, caracterizado porque
- a) se reduce un compuesto carbonílico en presencia de la oxidorreductasa según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, NADH y agua para dar el correspondiente (S)-hidroxicompuesto,
- 10 b) el NAD formado mediante la oxidorreductasa se reduce con una deshidrogenasa y un cosustrato simultáneamente para dar NADH,
- c) se realizan las reacciones en presencia de un disolvente orgánico y
- d) se aísla el (S)-hidroxicompuesto quiral formado.
19. Procedimiento según la reivindicación 14, 15, 17 ó 18, caracterizado porque como cosustrato se utiliza etanol, 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol o 2-octanol.
- 15 20. Procedimiento según la reivindicación 15 ó 18, caracterizado porque como deshidrogenasa se utiliza la levadura de panadería de *Candida boidinii* o *Candida parapsilosis*.
21. Procedimiento según la reivindicación 15 ó 18, caracterizado porque como deshidrogenasa se utiliza formiato deshidrogenasa dependiente de NADH y como cosustrato una sal del ácido fórmico tal como formiato de amonio, formiato de sodio o formiato de calcio.
- 20 22. Procedimiento según la reivindicación 16 ó 18, caracterizado porque como disolvente orgánico se utilizan dietil éter, terc-butilmetil éter, diisopropil éter, dibutil éter, acetato de butilo, heptano, hexano o ciclohexano.
23. Procedimiento según la reivindicación 16 ó 18, caracterizado porque la fase orgánica asciende a del 5% al 80% del volumen de reacción total, preferiblemente del 10% al 40%.
24. Procedimiento para la obtención de (R)-hidroxicompuestos quirales de fórmula II,
- 25 
$$R1-C(OH)-R2 \quad (II)$$
- con un resto R1 de
- 1) -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), en el que alquilo es lineal o ramificado,
- 2) -alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), en el que alqueno es lineal o ramificado y según la longitud de cadena contiene uno, dos, tres o cuatro dobles enlaces,
- 30 3) -alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), en el que alquino es lineal o ramificado y opcionalmente contiene uno, dos, tres o cuatro triples enlaces,
- 4) -arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>),
- 5) -alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>),
- 35 6) -heterociclo (C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>), que no está sustituido o está de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro, o
- 7) -cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>),
- en el que los restos R1 mencionados en 1) a 7) no están sustituidos o están mono, bi o trisustituidos, independientemente entre sí, con
- a) -OH,
- 40 b) halógeno, tal como flúor, cloro, bromo o yodo,
- c) -NO<sub>2</sub> o
- d) -NH<sub>2</sub> y

con un resto R2 de

- 1) -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que alquilo es lineal o ramificado,
- 2) -alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), en el que alqueno es lineal o ramificado y según la longitud de cadena contiene uno, dos o tres dobles enlaces,
- 3) -alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), en el que alquino es lineal o ramificado y opcionalmente contiene uno o dos triples enlaces, o
- 4) -alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>10</sub>)-C(O)-O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), en el que alquilo es lineal o ramificado y no está sustituido o está de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro,

en el que los restos R2 mencionados en 1) a 4) no están sustituidos o están mono, bi o trisustituidos, independientemente entre sí, con

- a) -OH,
- b) halógeno, tal como flúor, cloro, bromo o yodo,
- c) -NO<sub>2</sub> o
- d) -NH<sub>2</sub>,

caracterizado porque

- a) se incuba una mezcla que contiene el compuesto racémico de fórmula II, con la oxidoreductasa según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, NAD y agua y
- b) se aísla el (R)-hidroxicompuento quiral restante de fórmula II.

25. Procedimiento para la obtención de (R)-hidroxicompuentos quirales de fórmula II según la reivindicación 24, caracterizado porque

- a) se incuba una mezcla que contiene el compuesto racémico de fórmula II, con la oxidoreductasa según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, NAD y agua,
- b) el NADH formado mediante la oxidoreductasa se oxida con un cosustrato para dar NAD y
- c) se aísla el (R)-hidroxicompuento quiral restante de fórmula II.

26. Procedimiento para la obtención de (R)-hidroxicompuentos quirales de fórmula II según la reivindicación 24, caracterizado porque

- a) se incuba una mezcla que contiene el compuesto racémico de fórmula II, con la oxidoreductasa según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, NAD y agua,
- b) el NADH formado mediante la oxidoreductasa se oxida con una deshidrogenasa y un cosustrato para dar NAD y
- c) se aísla el (R)-hidroxicompuento quiral restante de fórmula II.

27. Procedimiento para la obtención de (R)-hidroxicompuentos quirales de fórmula II según la reivindicación 24, caracterizado porque

- a) se incuba una mezcla que contiene el compuesto racémico de fórmula II con la oxidoreductasa según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, NAD y agua,
- b) se realizan las reacciones en presencia de un disolvente orgánico y
- c) se aísla el (R)-hidroxicompuento quiral restante de fórmula II.

28. Procedimiento para la obtención de (R)-hidroxicompuentos quirales de fórmula II según la reivindicación 24, caracterizado porque

- a) se incuba una mezcla que contiene el compuesto racémico de fórmula II con la oxidoreductasa según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, NAD y agua,
- b) se realizan las reacciones en presencia de un disolvente orgánico,

- c) el NADH formado mediante la oxidorreductasa se oxida con una deshidrogenasa y un cosustrato para dar NAD y
  - d) se aísla el (R)-hidroxicompuesto quiral restante de fórmula II.
29. Procedimiento según la reivindicación 25, 26 ó 28, caracterizado porque como cosustrato se utiliza acetona.