



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 115**

51 Int. Cl.:
C07D 333/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04765718 .4**

96 Fecha de presentación : **30.09.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1670779**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.2006**

54

Título: **Método para la producción de 3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol.**

30

Prioridad: **01.10.2003 DE 103 45 772**

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: **BASF SE**
67056 Ludwigshafen, DE

72

Inventor/es: **Stürmer, Rainer;**
Kessler, Maria;
Hauer, Bernhard;
Friedrich, Thomas y
Breuer, Michael

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

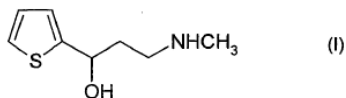
ES 2 357 115 T3

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

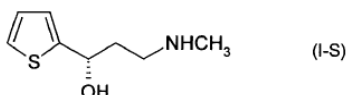
Método para la producción de 3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol.

La presente invención describe un método para la producción de 3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol de la fórmula I

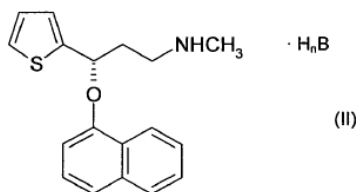


5 y en particular un método para la producción del enantiómero S, I-S.

El enantiómero S del aminopropanol I de la fórmula I-S



es un precursor importante para la síntesis del antidepresivo Duloxetina de la fórmula II



10 donde B representa un radical ácido orgánico o inorgánico con n cargas negativas y H_nB representa un ácido farmacéuticamente compatible.

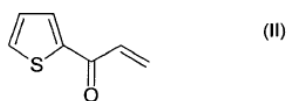
Los métodos del estado de la técnica para la producción de duloxetinao bien de su base correspondiente son costosos y requieren el empleo de reactivos quirales o insumos quirales.

15 De este modo la EP-B-0273658 describe un método para la producción de la base correspondiente de duloxetina mediante la reacción de 2-acetiltiofeno en una reacción de Mannich con formaldehído y dimetilamina, reducción del grupo ceto de la base Mannich allí obtenida hasta el (S)-3-N,N-dimetilamino-1-(tien-2-il)propan-1-ol racémico, formación del éter de la función alcohol con fluoruro de naftilo y finalmente formación del grupo dimetilamino en una funciónmetilamino. Se obtiene el enantiómero deseado del éter de naftilo mediante el empleo de materiales de partida 20 quirales o mediante separación del racemato en la etapa del producto final, por ejemplo en las sales con ácidos ópticamente activos o cromatografía sobre una fase estacionaria quiral.

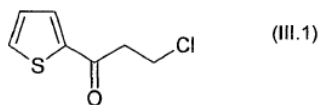
La US-5,362,886 describe un método análogo, en el cual al propanol racémico obtenido después de la reducción del grupo cetose añade ácido S-mandélico. El enantiómero S del alcohol obtenido con ello es empleado en las etapas subsiguientes de reacción.

25 Así mismo la EP-A-0457559 describe un método análogo al de la EP-B-0273658. Aquí se reduce el grupo ceto de la reacción de Mannich con el sistema asimétrico de reducción LAH-Icb (hidruro de litio y aluminio-[(2R,2S)-(-)-4-dimetilamino-1,2-difenil-3-metil-2-butanol]) hasta alcohol en la forma de enantiómero S. Además aquí es desventajosa, aparte de los costos, la sensibilidad del sistema de reducción LAH-Icb, el cual es estable sólo por unos pocos minutos.

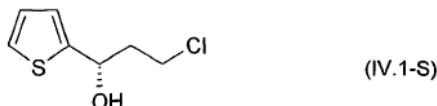
30 También W. J. Wheeler y F. Kuo describen en Journal of Labelled Compounds ADN Radiopharmaceuticals, volumen XXXVI, Nr. 3, páginas 213 a 223 un método para la producción de duloxetina. En éste, el cloruro de ácido tiofen-2-carboxílico reacciona en un acoplamiento de Stille con vinil-tri-n-butilestanano en presencia de cantidades catalíticas de bencilcloro-bis (trifenilfosfin)paladio(II) en DMPU (dimetilpropilenurea) hasta dar 1-(tien-2-il)-propenona de la fórmula II



la cual a continuación es convertida mediante tratamiento con cloruro de hidrógeno en 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona de la fórmula III.1



La cloropropanona III.1 así obtenida es a continuación reducida mediante el empleo de una oxazaborolidina quirral y BH_3 para dar (S)-3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol de la fórmula IV.1-S



5

El alcohol IV.1-S así obtenido es convertido mediante reacciones sucesivas con yoduro de sodio y a continuación con metilamina en (S)-3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol I-S. Mediante las reacciones subsiguientes sucesivas con hidruro de sodio, 1-fluoronaftalina y cloruro de hidrógeno, se obtiene duloxetina en forma del clorhidrato. Por un lado aquí es desventajoso que para la producción del producto intermedio cloropropanona III.1 se requieren numerosas etapas y costosos reactivos. Por otro lado en la conversión de la cloropropanona III.1 en el aminoalcohol se aísla el cloropropanol IV.1-S. Sin embargo investigaciones de quien registra la patente han mostrado que este cloropropanol es sensible y se descompone fácilmente en una reacción fuertemente exotérmica, lo cual conduce no sólo a pérdidas de rendimiento respecto al aminoalcohol, sino que también dificulta el manejo de la reacción a escala técnica.

10

De la literatura se conocen métodos para la producción de la 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona que se forma como producto intermedio en la síntesis de duloxetina, descrita por W. J. Wheeler et al. Sin embargo es una desventaja de los métodos conocidos en el estado de la técnica que, o bien se forma la cloropropanona III.1 con pobre rendimiento o tiene que ser trabajada con reactivos de difícil manipulación. De este modo describen A. Etienne et al. en CR Acad. Sci., Ser. C, 1979, 288 (1), 49-52, la producción de la cloropropanona III.1 mediante reacción de Friedel-Crafts de tiofeno con cloruro de 3-cloropropionilo en presencia de cloruro de aluminio como catalizador ácido Lewis y en nitrometano como solvente. Se obtiene la cloropropanona III.1 con un rendimiento de tan sólo 7%. También la reacción correspondiente descrita por Liu et al. en Quirality, 12, 26-29 (2000), en presencia de tetracloruro de estaño como catalizador ácido Lewisy benceno como solvente conduce a rendimientos poco satisfactorios. Meth-Cohn et al. describen en Acta Chem. Scand. v 20 (6), 1577-1587 (1966) la correspondiente acilación Friedel-Crafts sobre tiofeno en presencia de tricloruro de hierro o bien tricloruro de aluminio, donde se forma la cloropropanona III.1 en rendimiento moderado a bueno. Aquí es desventaja que tienen que emplearse disulfuro de carbono como solvente.

15

20

25

Kamal, G. B. R. Khanna, R. Ramu y T. Krishnaji describe en Tetrahedron Lett. 44, 2003, 4783-4787 la producción del precursor de duloxetina (S)-3-hidroxi-3-(tien-2-il)-propanonitrilo mediante acetilación de tiofeno con cloruro de cloroacetilo, la reducción de la cetona con borohidruro de sodio hasta dar el alcohol racémico, sustitución del radical cloro con cianuro y reacción del nitrilalcohol racémico con acetato de vinilo en presencia de una lipasa de Pseudomonas cepacia (inmovilizadas sobre diatomita), donde la lipasa cataliza de manera selectiva la esterificación de enantiómero R, de modo que el enantiómero S que permanece no esterificado puede ser aislado en una forma pura. Aquí es una desventaja por un lado el gran número de etapas de reacción requeridas y por el otro la pérdida de la mitad del nitrilalcohol, puesto que en la fracción R esterificada no reacciona nuevamente hasta dar duloxetina.

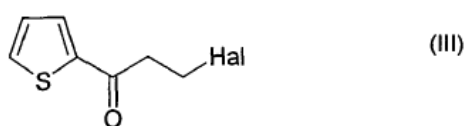
30

De allí que fue un objetivo de la presente invención poner a disposición un método para la producción de 3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol I, el cual venciera la dificultad del estado de la técnica aquí descrita. Además debería proveer el compuesto I en buen rendimiento total y en particular también permitir la producción S-enantioselectiva de enantiómero I-S.

35

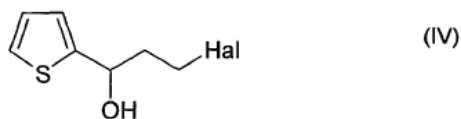
El objetivo fue logrado primero que todo mediante una transformación del tiofeno en una reacción de Friedel-Crafts con halogenuro de β -halogenopropionilo o un halogenuro de acrililo en presencia de un ácido Lewis, donde antes del aislamiento del producto de reacción se introduce un halogenuro de hidrógeno. A continuación se reduce el grupo ceto de la 3-halógeno-1-(tien-2-il)-propan-1-ona de la fórmula III que fue allí obtenida

40



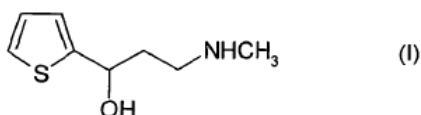
Hal= halógeno

y se hace reaccionar el producto reducido de la fórmula IV



con metilamina.

De allí que se describe un método para la producción de 3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol de la fórmula I



5 en el cual

a) se hace reaccionar tiofeno con un halogenuro de β -halogenopropionilo o un halogenuro de acrililo en presencia de un ácido Lewis hasta dar una 3-halógeno-1-(tien-2-il)-propan-1-ona, donde simultáneamente o después de ocurrida la reacción, aunque antes del aislamiento del producto de reacción, se añade un halogenuro de hidrógeno

10 b) se reduce la propanona obtenida en la etapa a) y a continuación, preferiblemente sin aislamiento del producto de reacción, se hace reaccionar con metilamina.

El método acorde con la invención provee un compuesto objetivo I en buen rendimiento total. La producción de la halopropanona III de la etapa intermedia no está además acoplada al uso de costosos reactivos orgánicos de estaño. El halopropanol IV de difícil manipulación no necesita ser separado. Además el método permite una forma sencilla de producción enantioselectiva del enantiómero-S I-S, en lo cual se ejecuta la reducción de la halopropanona III de la etapa intermedia en presencia de un catalizador quiral o un agente de reducción quiral, el cual exhibe una selectividad referida a la formación de (S)-3-halogeno-1-(tien-2-il)-propan-1-ol I-S.

En el marco de la presente invención "enantioselectividad" significa que el exceso de enantiómero ee (en %) del enantiómero S, el cual puede ser calculado en forma de por si conocida según:

20
$$ee (\%) = \frac{\text{enantiómero S} - \text{enantiómero R}}{\text{enantiómero S} + \text{enantiómero R}} \times 100$$

es de por lo menos 50 %, preferiblemente por lo menos 80 %, en particular por lo menos 90 % y especialmente por lo menos 95 %.

25 Mediante la introducción del halogenuro de hidrógeno, durante o preferiblemente después de ocurrida la acilación, aunque antes del aislamiento del producto de reacción, como producto final de la etapa a) no se obtiene esencialmente nada de 1-tien-2-il-propenona II, la cual en el método del estado de la técnica se presenta siempre como subproducto y disminuye el rendimiento en el producto deseado de acilación III.

30 Como ácidos Lewis entran en consideración los halogenuros metálicos, covalentes y halogenuros semimetálicos que exhiben un espacio para un par de electrones. Por regla general se eligen de entre compuestos halogenados de titanio, estaño, aluminio, vanadio, hierro o boro. Se prefieren los cloruros; sin embargo en el caso del aluminio son adecuados también los cloruros de monoalquilaluminio y los cloruros de dialquilaluminio. En el caso del boro también es adecuado el fluoruro. Son ejemplos de ácidos Lewis el tetracloruro de titanio, tricloruro de boro, trifluoruro de boro, tetracloruro de estaño, pentacloruro de vanadio, tricloruro de hierro, tricloruro de aluminio, dicloruro de alquilaluminio y cloruro de dialquilaluminio. De modo particularmente preferido se emplea tricloruro de aluminio.

35 Son halogenuros de β -halopropionilo adecuados cloruro de 3-cloro propionilo y bromuro o cloruro de 3-bromopropionilo. Se emplea preferiblemente cloruro de 3-cloropropionilo.

Como halogenuro de ácido acrílico se emplea preferiblemente cloruro de ácido acrililo.

En la etapa a) se emplea como agente acilación preferiblemente un halogenuro de β -halopropionilo.

40 Son halogenuros de hidrógeno adecuados cloruro de hidrógeno y bromuro de hidrógeno. Se emplea preferiblemente un halogenuro de hidrógeno en el cual el átomo de halógeno del radical β -halógeno corresponde al halogenuro de β -halopropionilo. Consecuentemente, se emplea cloruro de hidrógeno en el uso de cloruro de 3-cloropropionilo.

Como solventes para la reacción en la etapa a) son adecuados todos los empleados comúnmente en reacciones de acilación Friedel-Crafts. Fundamentalmente son adecuados los solventes apróticos que no reducen la reactividad de los reactivos empleados, en particular de los ácidos Lewis, o bien que bajo las condiciones indicadas de reacción no tienen reacciones competitivas con los ácidos Lewis. Para ello son ejemplos los aromáticos en sí mismos que van a ser

- 5 acilados (es decir tiofeno), hidrocarburos aromáticos que en comparación con el tiofeno son acilados de manera claramente más difícil, como benceno, nitrobenceno e hidrocarburos aromáticos halogenados, como por ejemplo clorobenceno y diclorobenceno, además hidrocarburos alifáticos halogenados, en particular haloalcanos, como clorometano, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, cloroetano, di- y tricloroetano. Son también adecuadas las mezclas de los solventes antes mencionados. Preferiblemente se emplean solventes en los cuales la acilación Friedel-Crafts transcurre de manera esencialmente homogénea como nitrobenceno o hidrocarburos halogenados. Se prefieren en particular hidrocarburos aromáticos o alifáticos halogenados, donde se prefieren los haloalcanos. Especialmente se emplean dicloroetano o clorobenceno.
- 10 El ácido Lewis tiene que ser empleado en cantidades estequiométricas, referido a la cantidad teórica que se va a alcanzar de tiofeno acilado, puesto que él forma un complejo con la cetona formada en la acilación, el cual es estable bajo las condiciones normales de la reacción de Friedel-Crafts. Preferiblemente se emplea una relación molar de 1:1 a 1:2, particularmente preferido de 1:1 a 1:1,5 y en particular de 1:1,1 a 1:1,5, referida a 1 mol del componente de acilación empleado en la menor fracción (tiofeno o halogenuro de β -halopropionilo).
- 15 Se emplean tiofeno y el halogenuro de β -halopropionilo en una relación molar de preferiblemente 1:0,5 a 1:2, particularmente preferido de 1:0,7 a 1:1,5 y en particular de 1:0,8 a 1:1,2.
- El orden en el cual se entremezclan los reactivos para la acilación Friedel-Crafts es de importancia secundaria. De este modo por ejemplo el ácido Lewis puede estar presente en el solvente y añadirse primero el halogenuro de β -halopropionilo y a continuación añadir el tiofeno. De modo alternativo pueden estar presentes el tiofeno y ácido Lewis y añadirse el halogenuro de β -halopropionilo.
- 20 Por regla general es ventajoso enfriar durante la adición del halogenuro de β -halopropionilo, puesto que la reacción de ácido Lewis con el halogenuro en general transcurre de manera fuertemente exotérmica. La temperatura de reacción es elegida, entre otros, dependiendo del solvente. Comúnmente esta en el rango de 10 °C a 40 °C. Empleando hidrocarburos halogenados, en particular haloalcanos, la temperatura de reacción es de modo adecuado como máximo 50 °C, puesto que de otro modo el solvente entra en reacción. Preferiblemente la temperatura de reacción está entre -20 °C y 40 °C, particularmente preferido 0 a 30 °C.
- 25 En principio la presión de reacción no es crítica. En general la reacción es llevada a cabo a presión normal; sin embargo ella puede ocurrir a sobre- o baja presión. Se aplica normalmente sobrepresión cuando el solvente es fácilmente volátil o no es líquido bajo condiciones normales, como es el caso del clorometano.
- 30 La introducción del halogenuro de hidrógeno ocurre preferiblemente después de que ha ocurrido la acilación. La terminación de la reacción de acilación puede ser determinada según métodos comunes del estado de la técnica como por ejemplo mediante cromatografía de gases, cromatografía en capa delgada o espectroscopia de RMN. La duración de la introducción depende entre otros del tamaño de la carga y puede ser determinada por el experto en el caso particular. Por regla general ella ocurre por lo menos por el tiempo necesario para que no se evidencie ya más 1-tien-2-il-propenona.
- 35 Para el reacondicionamiento del producto de acilación, por regla general se acondiciona hidrolíticamente primero que todo la mezcla de reacción, para escindir el complejo formado de cetona-ácido Lewis. Para la hidrólisis se emplea como solvente agua o también ácidos minerales diluidos en agua como por ejemplo ácido clorhídrico diluido. Las posteriores purificación y aislamiento ocurren según métodos conocidos, como se describe por ejemplo en Organikum, editorial VEB Deutscher der Wissenschaften, 17a edición, 1988, p. 323 y siguientes.
- 40 En la etapa a) se conduce el método acorde con la invención en alto rendimiento hasta una 3-halógeno-(tien-2-il)-1-propanona III. En el curso de la reacción de acilación, dado el caso la 1-tien-2-il-propenona II formada se convierte de manera esencialmente completa en la 3-halógeno-(tien-2-il)-1-propanona III, de modo que la mezcla de reacción contiene como máximo 1 % molar, particularmente preferido como máximo 0,5 % molar de propenona II, referido al rendimiento de 3-halógeno-(tien-2-il)-1-propanona III.
- 45 La reducción de la propanona III en la etapa b) ocurre de manera exitosa por ejemplo con un hidruro metálico o semimetálico o con hidrógeno en presencia de un catalizador adecuado de metal de transición.
- Son hidruros metálicos o semimetálicos adecuados tanto los hidruros neutros como también los hidruros complejos de metales o bien semimetales. De manera conveniente se emplean hidruros metálicos o semimetálicos, los cuales se han probado en la reducción de cetonas hasta alcoholes. Preferiblemente son hidruro de boro o de aluminio.
- 50 Son hidruros neutros adecuados por ejemplo borano (BH_3 ; B_2H_6), alano (AlH_3), silano (SiH_4), mono- y dialquilboranos, como bis(3-metilbut-2-il)borano (disiamilborano) o 9-borabiciclo[3.3.1]nonano (9-BBN), compuestos de mono- y dialquilaluminio, como hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H), y trialkilsilanos, como trimetilsilano o trietilsilano.
- 55 Son hidruros complejos adecuados por ejemplo borohidruros complejos, como borohidruro de sodio (NaBH_4), borohidruro de litio (LiBH_4) o borohidruro de calcio $\text{Ca}[\text{BH}_4]_2$, hidruros complejos de aluminio, como hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4), borohidruros complejos de alquilo o alcoxi, como trietilborohidruro de litio o triisopropoxiborohidruro de potasio ($\text{KB}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_3\text{H}$), o hidruros complejos de alquilo- o alcoxi-aluminio, como hidruro de dietilaluminio de sodio,

bis(2-metoxietoxi)aluminio-hidruro de litio ($\text{Li-Al}[\text{OC}_2\text{H}_4\text{OCH}_3]_2\text{H}_2$), bis(2-metoxietoxi)aluminiohidruro de sodio ($\text{NaAl}[\text{OC}_2\text{H}_4\text{OCH}_3]_2\text{H}_2$; "RedAl") o aluminotris(tert-butoxi)hidruro de litio ($\text{Li-Al}[\text{OC}(\text{CH}_3)_3]_3\text{H}$) y similares.

5 Los solventes adecuados para la reducción con hidruro metálicos o semimetálicos dependen en particular del agente reductor empleado y evidentemente no debería contener ningún grupo que pudiese así mismo reducirse bajo las condiciones de reacción. De este modo, la reducción se ejecuta con los hidruros previamente mencionados preferiblemente solventes apróticos sin grupos funcionales que sean reducibles bajo las condiciones indicadas de reacción. Son ejemplos de ello los hidrocarburos aromáticos y alifáticos, por ejemplo alcanos $\text{C}_5\text{-C}_8$ y cicloalcanos $\text{C}_5\text{-C}_8$, como pentano, hexano, heptano, ciclopentano, ciclohexano y ciclooctano, aromáticos como benceno, tolueno, nitrobenzono, cloro- y diclorobenceno, además éteres de cadena abierta y cíclicos con 4 a 8 átomos de carbono, como dietiléter, metiltert-butiléter, tetrahidrofurano o dioxano, además hidrocarburos clorados, en particular haloalcanos, como clorometano, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, di- o tricloroetano. Son también adecuadas mezclas de los solventes antes mencionados. Se emplean preferiblemente los hidrocarburos aromáticos antes mencionados, éteres o hidrocarburos halogenados.

15 La reducción con algunos de los hidruros complejos arriba mencionados, en particular con los hidruros menos reactivos, con borohidruro de sodio, funciona bien también en presencia de solventes próticos, por ejemplo de alcoholes $\text{C}_1\text{-C}_3$, wie metanol, etanol, propanol o isopropanol, o incluso en solución acuosa. En este caso se emplea preferiblemente una mezcla de por lo menos uno de los solventes apróticos antes mencionados y por lo menos un alcohol. Puesto que los hidruros son estables en solventes próticos, la reacción ocurre mediante el empleo de solventes próticos preferiblemente en presencia de una base adecuada. Son bases adecuadas por ejemplo los hidróxidos de metales alcalinos, como hidróxido de sodio o potasio, o carbonatos de metales alcalinos, como carbonato de sodio o de potasio. Se emplea preferiblemente hidróxido de sodio.

25 La reducción con varios de los hidruros metálicos o semimetálicos antes mencionados transcurre frecuentemente de manera exotérmica, de modo que de manera adecuada la reacción es llevada a cabo disipando el calor de reacción, es decir bajo enfriamiento. La temperatura de reacción esta preferiblemente en -50 a 40 °C, particularmente preferido -30 a 30 °C y en particular -20 a 20 °C. La reducción puede ser llevada a cabo según métodos comunes del estado de la técnica, como se describen por ejemplo en Organikum, editorial VEB Deutscher der Wissenschaften, 17a edición, 1988, p. 492 y siguientes. En ello por regla general se presenta la propanona III y se añade en porciones el agente reductor. Sin embargo también es posible añadir en porciones simultáneamente propanona III y agente reductor.

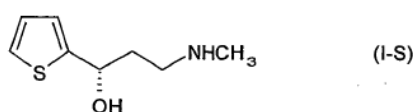
30 [0037] La reducción de la propanona III ocurre bien por ejemplo también con un alcoholato de aluminio. La reducción de cetonas con un alcoholato de aluminio se define también comúnmente como reducción de Meerwein-Ponndorf-Verley. En ello se convierte una cetona en el correspondiente alcohol y se oxida el alcoholato simultáneamente hasta el correspondiente aldehído (en alcoholatos de alcoholes primarios) o bien a cetona (en alcoholatos de alcoholes secundarios). La ejecución de la reacción puede ocurrir según métodos conocidos, como se describen por ejemplo en Organikum, editorial VEB Deutscher der Wissenschaften, 17a edición, 1988, p. 486 y siguientes.

35 Además la reducción de la propanona III ocurre bien también mediante hidrogenación catalítica, es decir mediante reacción de la propanona III con hidrógeno en presencia de catalizadores adecuados de metales de transición. Entre los metales de transición adecuados se cuentan los metales de los grupos secundarios VIII, VI y I, en particular platino, rutenio, cobre, cromo y níquel. Evidentemente los catalizadores tienen que ser elegidos de modo que no catalicen la hidrogenación del grupo tiofeno. Los catalizadores pueden emplearse tanto como catalizadores heterogéneos como también como catalizadores homogéneos. En principio se conocen métodos adecuados y se describen por ejemplo en Transition Metals in Organic Synthesis. M. Beller, C. Bolm, Wiley-VCH, Weinheim, 1998, volumen 2, página 1 y siguientes (catalizadores homogéneos) o bien página 81 y siguientes (catalizadores heterogéneos).

45 La reducción en la etapa b) ocurre preferiblemente con un hidruro metálico o semimetálico y de modo particularmente preferido con uno de los hidruros metálicos o semimetálicos complejos antes mencionados. En especial se emplea borohidruro de sodio.

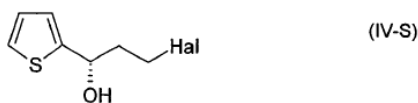
Con los agentes no asimétricos de reducción antes mencionados se reduce particularmente la 3-halógeno-1-(tien-2-il)-propan-1-ona III proquiral hasta el alcohol racémico IV. La subsiguiente reacción con metilamina conduce de modo correspondiente hasta el 3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol I racémico.

50 En una forma preferida de operar el método acorde con la invención sirve para la producción de (S)-3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol de la fórmula I-S



o bien de la mezcla con los enantiómero R, I-R, donde el enantiómero I-S predomina en la mezcla, donde se lleva a cabo la reducción de la etapa b) en presencia de un agente quiral de reducción o un catalizador quiral, el cual exhibe una selectividad respecto a la formación de (S)-3-metilamino-1-(tien-2-il)propan-1-ol I-S.

Con esto se reduce la halopropanona III proquiral en la etapa b) de manera enantioselectiva hasta el S-halopropanol de la fórmula IV-S



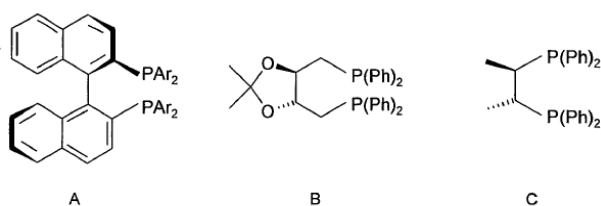
5 o bien hasta una mezcla de enantiómeros S- y R, en la cual predomina el enantiómero S. Con este propósito se coloca como agente de reducción en la etapa b) por ejemplo un hidruro metálico o semimetálico asimétrico o se lleva a cabo la reducción en presencia de un compuesto promotor asimétrico de inducción.

10 Los hidruros metálicos o semimetálicos asimétricos son preferiblemente hidruros asimétricos de aluminio, boro o silicio. Por ejemplo en E. J. Corey, C. J. Helal, *Angew. Chem.* 1998, 110, 2092-2118 o en M. M. Midland, L. A. Morell, *Methoden Org. Chem.*, Houben-Weyl, 4a edición, vol E 21 d, p. 4082-4098, 1995 se describen por ejemplo borohidruros asimétricos adecuados, de lo cual se hace aquí referencia en toda su extensión. En H. Brunner, *Methoden Org. Chem.*, Houben-Weyl, 4a edición, volumen E21d, pp. 4074-4081, 1995 entre otros se describen hidruros asimétricos de silicio adecuados, de lo cual así mismo se hace referencia en toda su extensión.

15 En el marco de la presente invención, entre los compuestos asimétricos promotores de inducción se entienden aquellos que mediante la influencia del verdadero agente reductor, por ejemplo mediante formación de enlaces o formación de complejos con el agente reductor o mediante captación de un átomo de hidrógeno u otro componente reductor del agente reductor, desarrolla la reducción de la propanona III de manera enantioselectiva. Por regla general los compuestos asimétricos promotores de inducción no se reducen.

20 A ellos pertenecen los catalizadores asimétricos de hidrogenación. En la hidrogenación asimétrica sirve hidrógeno como verdadero agente reductor, mientras que el catalizador asimétrico favorece la formación enantioselectiva de uno de los enantiómeros posibles. La hidrogenación puede ocurrir tanto en fase heterogénea como también en fase homogénea. Por ejemplo en A. Baiker, H. U. Blaser en *Handbook of Heterogeneous Catalysis*, volumen 5 (editor G. Ertl, H. Knörzinger, J. Weitkamp), Wiley-VCH, Weinheim, 1997, 2422-2436 se describen catalizadores adecuados para la hidrogenación asimétrica en fase heterogénea, de lo cual se hace aquí referencia en toda su extensión.

25 Sin embargo, son de mayor importancia catalizadores para la hidrogenación en fase homogénea. Son particularmente adecuados catalizadores que contienen un metal del grupo secundario VIII, por ejemplo platino o rutenio, en particular rutenio, y por lo menos un ligando que contiene fósforo. Por ejemplo en R. Noyori, T. Ohkuma, *Angew. Chem.* 2001, 113, 40-75 se describen catalizadores adecuados, de lo cual se hace aquí referencia en toda su extensión. En particular son adecuados los complejos rutenio (II)-diamina, en los cuales el rutenio además está unido a un ligando bidentado quiral difosfano. Son ejemplos de ligandos difosfano, que son adecuados para la reducción de la halopropanona III hasta el S-halopropanol IV-S, (R)-BINAP de la fórmula A, (R,R)-DIOP de la fórmula B y (R, R)-CHIRAPHOS de la fórmula C



Ar= fenilo (BINAP)

Ph= Fenilo

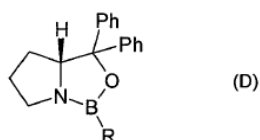
4-metilfenilo (ToIBINAP)

35 3,5 dimetilfenilo (XiIBINAP)

Además los catalizadores particularmente preferidos contienen un ligando diamina. Son ejemplos de ligandos diamina adecuados 1,2-etilendiamina, 1,2-difenil-1,2-etilendiamina y 1,2-ciclohexanodiamina en su forma enantiomérica.

La hidrogenación ocurre por regla general bajo las condiciones antes descritas.

Un compuesto asimétrico promotor de inducción particularmente preferido es la oxazaborilidina de la fórmula D



donde R representa alquilo C₁-C₄, como metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo o tert-butilo y en particular metilo.

5 Con este reactivo, las cetonas proquirales puede ser convertidas con alta enantioselectividad en alcoholes secundarios (E. J. Corey, Pure Appl. Chem. 62, 1209, 1990; E. J. Corey, J. O. Link, J. Am. Chem. Soc. 114, 1906, 1992). Como verdadero agente de reducción sirven los boranos, por ejemplo BH₃, dialquilboranos, dialcoxiboranos o diariloxiboranos. La reacción de la cloropropanona III.1 con la oxazaborilidina D (R = metilo) y BH₃ hasta el S-cloropropanol IV.1-S fue ya descrita por W. J. Wheeler y F. Kuo en Journal of Labelled Compounds ADN Radiopharmaceuticals, volumen XXXVI, Nr. 3, pp. 213-223.

10 Por regla general en la reducción se emplea la oxazaborilidina en cantidades catalíticas. El borano es empleado en cantidades por lo menosequimolares, referido a la halopropanona III, aunque preferiblemente en exceso. La mayoría de las veces la reacción ocurre en solventes adecuados. Son solventes adecuados los solventes apróticos, que bajo las condiciones indicadas de reacción no poseen grupos que pueden ser reducidos. A éstos se cuentan en particular los ya mencionados haloalcanos, aromáticos y éteres cíclicos o acíclicos. Preferiblemente se emplean éteres, donde se prefiere particularmente tetrahidrofurano. La temperatura de reacción es preferiblemente -80 a 20 °C, particularmente preferido -30 a 10 °C. La ejecución ocurre por regla general de modo que se coloca la oxazaborilidina en el solvente y a la temperatura deseada de reacción se añade bien sea primero el borano y a continuación la halopropanona III o por el contrario primero la halopropanona III y a continuación el borano, donde se prefiere el primer modo de adición. Entre otros la duración de la reacción depende del tamaño de la carga y en casos aislados puede ser determinada por el experto.

20 Se ha visto de modo sorprendente que la reducción enantioselectiva en la propanona III hasta el S-halopropanol IV-S ocurre bien por la vía de la catálisis enzimática, en particular en presencia de una deshidrogenasa. De allí que en otra forma preferida de operar del método acorde con la invención, se emplea una deshidrogenasa como agente reductor.

25 En el método acorde con la invención, después de terminada la reducción, dependiendo del método de reducción empleado, dado el caso se desactiva o bien se elimina el catalizador empleado o bien el exceso de catalizador. En el empleo de los hidruros metálicos o semimetálicos, esto ocurre por regla general mediante hidrólisis, por ejemplo con una solución acuosa o alcohólica. También en el empleo de catalizadores homogéneos de hidrogenación o en la reducción con alcoholatos de aluminio, se trabaja frecuentemente bajo condiciones hidrolíticas. La reducción ocurre en forma de una hidrogenación catalítica en fase heterogénea o con una enzima como agente reductor, entonces puede eliminarse el catalizador o bien la enzima mediante separación física, por ejemplo mediante decantación o filtración. Sin embargo, en el empleo de sistemas homogéneos de reducción, en particular en la reducción con hidruros metálicos o semimetálicos, preferiblemente inicialmente no se desactiva.

30 Ha probado ser ventajoso cuando después de la producción no se aísla el halopropanol IV, sino que se hacen reaccionar directamente con metilamina hasta dar el 3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol I. Para ello se añade metilamina a la mezcla de reacción separada de los sistemas heterogéneos de reducción o, dado el caso, desactivada y se hace reaccionar preferiblemente a temperatura elevada, por ejemplo a 30 a 80 °C, en particular a 50 a 70 °C. La metilamina puede ser empleada bien sea en forma de gas o como solución acuosa, donde se prefiere el empleo como solución acuosa. Se emplea preferiblemente una cantidad de 1 a 100 equivalentes molares, particularmente preferido de 5 a 10 equivalentes molares, referido a la cantidad de la halopropanona III. La reacción ocurre preferiblemente a una presión de 1 a 250 bar y en particular bajo la propia presión generada por el sistema en sí mismo.

40 Después de ocurrida la reacción con metilamina se acondiciona la mezcla de reacción de manera común. Para esto se desactivan el catalizador o bien el agente reductor como ya se describió, en caso de que ello no haya ocurrido aún antes de la adición de metilamina, y se separan, se elimina el solvente y se aísla del residuo metilaminopropanol limpio por ejemplo mediante cristalización, digestión, extracción o cromatografía.

45 Con el método acorde con la invención se puede obtener 3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol I en buen rendimiento. En particular en la etapa a) del método no se requieren reactivos o solventes caros o de manipulación costosa y se forma la halopropanona III en muy alto rendimiento. En la etapa b) se evita el aislamiento del sensible halopropanol IV y una pérdida de rendimiento asociada con ello o bien la difícil manipulación del halopropanol IV. Además, de acuerdo con el método acorde con la invención puede obtenerse de manera selectiva el enantiómero S del metilaminopropanol I-S, el cual es esencial para la otra reacción hasta dar duloxetina, cuando en la etapa b) ocurre la reducción con un agente reductor quiral.

50 Otro objetivo de la presente invención se refiere además a un método para la producción de (S)-3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol de la fórmula I-S, en el cual se reduce de manera enantioselectiva 3-halo-1-(tien-2-il)-propan-1-ona III, caracterizado porque la reducción ocurre en presencia de una deshidrogenasa. En una forma preferida de operar del método, el (S)-3-halo-1-(tien-2-il)-propan-1-ol IV-S así obtenido reacciona sin aislamiento con metilamina. Respecto a deshidrogenasas adecuadas y preferidas y la ejecución del método, se remite expresamente a las siguientes formas de operar.

Formas bioquímicas de operar:

- 5 Las deshidrogenasas (EC 1.1.X.X) adecuadas son sobre todo deshidrogenasas (E.C. 1.1.1.x) en particular alcohol deshidrogenasas (E.C.1.1.1.1 o E.C.1.1.1.2), que causan la reducción selectiva de la halopropanona III hasta dar el S-halopropanol IV-S. La deshidrogenasa es extraída preferiblemente de un microorganismo, de modo particularmente preferido de una bacteria, un hongo, en particular una levadura, se deposita en cada caso en concentraciones madre o es obtenible a partir de aislados de fuentes naturales, como muestras de suelos, muestras de biomasa y similares. En particular, la deshidrogenasa proviene de una levadura o de una bacteria ácidoláctica.
- 10 La deshidrogenasa puede ser empleada en forma pura o parcialmente pura o en forma del microorganismo en sí mismo. Los expertos conocen suficientemente métodos para la obtención y purificación de las deshidrogenasas a partir los microorganismos, por ejemplo a partir de K. Nakamura & T. Matsuda, "Reduction of Ketones" en K. Drauz y H. Waldmann, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2002, Vol.III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim. Así mismo se conocen métodos recombinantes para la generación de deshidrogenasas, por ejemplo de W. Hummel, K. Abokitse, K. Drauz, C. Rollmann y H. Gröger, Adv. Synth. Catal. 2003, 345, Nr. 1 + 2, S. 153-159.
- 15 Por ejemplo son bacterias adecuadas las de los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Rhodococcus*, *Lactobacillus* o *Lactococcus*. Por ejemplo son levaduras adecuadas las de los géneros *Geotrichum*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* o *Saccharomyces*.
- De modo particularmente preferido se emplean las deshidrogenasas de levaduras y bacterias ácidolácticas. Bajo esto se prefieren las deshidrogenasas, que son obtenidas de levaduras del género *Geotrichum* o *Candida* o de las bacterias ácidolácticas del género *Lactobacillus* o *Lactococcus*.
- 20 Son ejemplos de tipos de *Lactobacillus* *L. brevis*, *L. kefir*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* y *L. sanfrancisco*.
- Son ejemplos de *Candida* *C. magnoliae*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. boidinii*, *C. parapsilosis* y *C. antarctica*.
- Son ejemplos de tipos de *Geotrichum* *G. candidum*, *G. clavatum* y *G. fermentans*.
- 25 De modo particularmente preferido se emplean deshidrogenasas de *Candida magnoliae*, *Geotrichum candidum* o *Lactobacillus brevis*.
- 30 Comúnmente, la reducción ocurre con la deshidrogenasa en presencia de una coenzima adecuada (también definida como cofactor). Como coenzimas para la reducción de la cetona sirven comúnmente NADH y/o NADPH. Además de ello, pueden emplearse deshidrogenasas como sistemas celulares, los cuales contienen de manera inherente el cofactor, o de modo alternativo añadirse mediadores redox (A. Schmidt, F. Hollmann y B. Bühler "Oxidation of Alcohols" en K. Drauz y H. Waldmann, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2002, Vol.III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim).
- 35 Comúnmente, la reducción ocurre con la deshidrogenasa además en presencia de un cosustrato adecuado, el cual por regla general hace las veces de agente reductor para la coenzima oxidada en el curso de la reducción regenerándola de este modo. Son ejemplos de cosustratos adecuados azúcar, en particular las hexosas, como glucosa, manosa, fructosa, y/o alcoholes oxidables, en particular etanol, propanol o isopropanol, así como formiato. Para la oxidación del cosustrato y unido a ello para la regeneración de la coenzima, puede añadirse una segunda deshidrogenasa, como por ejemplo glucosa-deshidrogenasa empleando glucosa como cosustrato. Esta puede añadirse como enzima libre o inmovilizada o en forma de células libres o inmovilizadas. Su producción puede ocurrir tanto en forma separada como también mediante coexpresión en una deshidrogenasa madre (recombinante).
- 40 Las deshidrogenasas empleadas de acuerdo con la invención pueden usarse libres o inmovilizadas. Se entiende por enzima inmovilizada aquella que está fija sobre un soporte inerte. Los materiales de soporte adecuados así como las enzimas inmovilizadas sobre ellos son conocidos a partir de las EP-A-1149849, EP-A-1 069 183 y la DE-OS 100193773 así como de los pasajes de literatura allí citados. Se hace referencia en toda su extensión a lo manifestado en estos escritos. A los materiales de soporte adecuados pertenecen por ejemplo arcillas, minerales de arcilla como caolinita, tierras diatomáceas, perlita, dióxido de silicio, dióxido de aluminio, carbonato de sodio, carbonato de calcio, celulosa en polvo, materiales de intercambio aniónico, polímeros sintéticos como poliestireno, resinas acrílicas, resinas de fenol-formaldehído, poliuretanos y poliolefinas como polietileno y polipropileno. Para la producción de las enzimas soportadas, los materiales de soporte son empleados comúnmente en forma de partículas finamente divididas, donde se prefieren las formas porosas. El tamaño de la partícula del material de soporte esta comúnmente en no más de 5 mm, en particular no más de 2 mm (curva granulométrica). De forma análoga en el empleo de la deshidrogenasa como catalizador Ganzzell puede elegirse una forma libre o inmovilizada. Los materiales de soporte son por ejemplo alginato de calcio y carragenina. Las enzimas también las células pueden ser encadenadas directamente con glutaraldehído (entrecruzamiento a CLEAs). Otros y correspondientes métodos de inmovilización se describen por ejemplo en J. Lalonde y A. Margolin "Immobilization of Enzymes" en K. Drauz y H. Waldmann, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2002, Vol.III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim.
- 50
- 55 La reacción de reducción puede ocurrir en medios acuosos o no acuosos o en sistemas de dos fases o (micro)emulsiones. Los medios acuosos de reacción son preferiblemente soluciones tamponadas, que exhiben por regla

general un valor de pH de 5 a 8, preferiblemente de 6 a 8. El solvente acuoso puede contener, aparte de agua, por lo menos un alcohol, por ejemplo etanol o isopropanol.

5 Por medios no acuosos de reacción deberían entenderse medios de reacción que contienen menos de 1 % en peso, preferiblemente menos de 0,5 % en peso de agua, referido al peso total del medio de reacción. Preferiblemente se lleva a cabo la reacción en un solvente orgánico. Son por ejemplo solventes adecuados hidrocarburos alifáticos, preferiblemente con 5 a 8 átomos de carbono, como pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, heptano, octano o ciclooctano, hidrocarburos alifáticos halogenados, preferiblemente con uno o dos átomos de carbono, como diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloroetano o tetracloroetano, hidrocarburos aromáticos como benceno, tolueno, los xilenos, clorobenceno o diclorobenceno, éteres alifáticos acíclicos y cíclicos, preferiblemente con 4 a 8 átomos de carbono, como dietiléter, metil-tert-butiléter, etil-tert-butiléter, dipropiléter, diisopropiléter, dibutiléter, tetrahidrofurano o ésteres como acetato de etilo o acetato de n-butilo o cetonas como metilisobutilcetona o dioxano o mezclas de ellos. De modo particularmente preferido se emplean los éteres antes mencionados, en particular tetrahidrofurano.

15 Por ejemplo, la reducción con la deshidrogenasa se lleva a cabo en un medio de reacción acuoso-orgánico, en particular acuoso.

La halopropanona III es empleada en la reducción enzimática preferiblemente en una concentración de 0,1 g/l a 500 g/l, particularmente preferido de 1 g/l a 50 g/l y puede ser dirigida de modo continuo o discontinuo.

20 Por regla general la reducción enzimática ocurre a una temperatura de reacción entre la temperatura de desactivación de la deshidrogenasa y preferiblemente a por lo menos -10 °C. De modo particularmente preferido esta en el rango de 0 a 100 °C, en particular de 15 a 60 °C y especialmente de 20 a 40 °C, por ejemplo en aproximadamente 30 °C.

25 Para la realización puede por ejemplo colocarse la halopropanona III con la deshidrogenasa, el solvente y dado el caso la coenzima, dado el caso con una deshidrogenasa auxiliares para la regeneración de la coenzima y/u otros cosustratos y homogeneizar la mezcla, por ejemplo mediante agitación o sacudiéndola. Por regla general también es posible inmovilizar la(s) deshidrogenasa(n) en un reactor, por ejemplo en una columna, e introducir al reactor una mezcla que contiene la halopropanona III y dado el caso la coenzima y/o cosustrato. Para ello puede conducirse la mezcla en circuito por el reactor hasta que se alcance el rendimiento deseado. Para ello se reduce el grupo ceto de la halopropanona III hasta un grupo OH, con lo cual surge de manera esencialmente selectiva el enantiómero S del halopropanol IV-S. Por regla general, se conduce la reducción hasta un rendimiento de por lo menos 70 %, particularmente preferido de por lo menos 85 % y en particular de por lo menos 95%, referido a la halopropanona III presente en la muestra. El avance de la reacción, es decir la reducción secuencial de la cetona, puede en ello ser seguida por métodos comunes como cromatografía de gases.

30 En el método acorde con la invención son empleadas como deshidrogenasas de modo particularmente preferido las alcohol-deshidrogenasas con por lo menos una de las siguientes propiedades:

35 Alcohol-deshidrogenasas, con una secuencia de aminoácidos, que abarcan en el segmento de extremo N-terminal a) una secuencia parcial de aminoácidos de por lo menos 5, 6, 7 u 8, preferiblemente por lo menos 10, como por ejemplo 10, 11, 12, 13, 14, o 15, residuos de aminoácidos en secuencia según SEQ ID NO: 1, donde adicionalmente preferiblemente la posición correspondiente a la posición de aminoácido 12 según SEQ ID NO:1 representa valina; o abarca b) una secuencia parcial de aminoácidos de por lo menos 5, 6, 7 u 8, preferiblemente por lo menos 10, como por ejemplo 10, 11, 12, 13, 14, o 15, radicales de aminoácidos en secuencia según SEQ ID NO: 2; y funcionalmente equivalente de ellos.

Alcohol-deshidrogenasas que tienen la capacidad de hacer la reducción de 3-cloro-1-(2-il)-propan-1-ona hasta (S)-3-cloro-1-(2-il)-propan-1-ol.

Alcohol-deshidrogenasas, que catalizan la reducción en una pureza de enantiómeros de por lo menos por lo menos 85 % ee (en presencia de NADH y/o NADPH; a 30 °C y pH 6.0).

45 Alcohol-deshidrogenasas, que están codificados de una secuencia de ácido nucleico que abarca SEQ ID NO:3, o que abarca una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 4 o abarca por lo menos una secuencia parcial según la figura 3, y preferiblemente son obtenibles a partir de *Lactobacillus brevis*; así como las alcohol-deshidrogenasas funcionalmente equivalentes derivadas de él.

50 Alcohol-deshidrogenasas que están codificadas de una secuencia de ácido nucleico que abarca SEQ ID NO:5, o que exhibe una secuencia de aminoácidos que abarca ID NO: 6, y son obtenibles preferiblemente a partir de *Candida magnoliae* (ATCC 12573); así como las alcohol-deshidrogenasas funcionalmente equivalentes derivadas de ella.

Se describe también una (S)-3-cloro-1-(2-il)-propan-1-ol-deshidrogenasa con por lo menos una de las propiedades previamente enumeradas.

55 Preferiblemente el rango de temperatura de estabilidad de la deshidrogenasa esta en 10 a 80 °C. El óptimo de temperatura de su actividad está preferiblemente en el rango de 20 a 60 °C, particularmente preferido de 25 a 40 °C. El

rango de estabilidad para el pH esta preferiblemente en pH 4 a 10 . El pH óptimo para la deshidrogenación esta preferiblemente en el rango de pH 5 a 8.

5 Además la deshidrogenasa descrita tiene preferiblemente la capacidad de hacer la deshidrogenación de (S)-3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol hasta 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona en presencia de NAD⁺ o NADP⁺. Ella exhibe preferiblemente un peso molecular en el rango de 30 ± 2 kDalton.

También se describe una secuencia de ácidos nucleicos que abarca la secuencia que codifica para la deshidrogenasa acorde con la invención o una secuencia parcial que codifica. Un ejemplo no limitante de ello es la secuencia representada en SEQ ID NO: 3 o 6.

10 Además se describe una cinta de expresión que abarca las secuencia de ácido nucleico acorde con la invención en enlace operativo con por lo menos una secuencias reguladoras de ácido nucleico.

Además se describe un vector recombinante que abarca por lo menos una cinta de expresión acorde con la invención.

Además se describe un patrón procariótico o eucariótico, transformado acorde con por lo menos un vector acorde con la invención.

15 Finalmente se describe el empleo de la deshidrogenasa acorde con la invención o un microorganismo que produce esta deshidrogenasa, para la producción de (S)-3-halo-1-(tien-2-il)-propan-1-ol y en particular para la producción de duloxetina.

Otras modificaciones de las deshidrogenasas descritas:

Así mismo se describen "funcionamente equivalentes" las enzimas manifestadas concretamente con actividad de (S)-3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol-deshidrogenasa y el empleo de estas en el método acorde con la invención.

20 En el marco de la presente invención, son "funcionamente equivalentes" o análogos de la enzima manifestadas concretamente, polipéptidos diferentes de ella que además poseen la actividad biológica deseada, como por ejemplo especificidad al sustrato. De este modo se entienden por ejemplo por "funcionamente equivalentes" enzimas que reducen 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-on hasta el correspondiente alcohol Sy que exhiben por lo menos 20 %, preferiblemente 50 %, particularmente preferido 75 %, muy particularmente preferido 90 % de la actividad de una
25 enzima que abarca una de las secuencias de aminoácidos enumeradas bajo SEQ ID NO:1, 2, 4 o 6 o representadas en la figura 3. Los funcionamente equivalentes son además preferiblemente estables entre pH 4 a 10 y poseen ventajosamente un pH óptimo entre pH 5 y 8 así como una temperatura óptima en el rango de 20°C a 80°C.

30 De acuerdo con la invención, se entiende por "funcionamente equivalentes" en particular también mutantes que exhiben por lo menos en una posición de las secuencias de aminoácidos arriba mencionadas, otro aminoácido al mencionado concretamente pero que a pesar de ello posee una de las actividades biológicas arriba mencionadas. Con ello "funcionamente equivalentes" incluye los mutantes obtenibles mediante una o varias adiciones, sustituciones, borrados y/o inversiones de aminoácidos, donde los cambios mencionados en cada posición de secuencia puede tener lugar en tanto ellos conduzcan a un mutante con perfil de propiedades acorde con la invención. También se da la equivalencia funcional cuando el modelo de reactividad entre el mutante y el polipéptido no modificado coincide cualitativamente, es
35 decir por ejemplo reaccionan los mismos sustratos con diferente velocidad.

De la siguiente tabla pueden tomarse ejemplos para sustituciones adecuadas de aminoácidos:

	Radical originario	Ejemplos de la sustitución
	Ala	Ser
	Arg	Lys
40	Asn	Gln; His
	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn
	Glu	Asp
45	Gly	Pro
	His	Asn ; Gln
	Ile	Leu; Val

Leu	Ile; Val
Lys	Arg ; Gln ; Glu
Met	Leu ; Ile
Phe	Met ; Leu ; Tyr
5 Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp ; Phe
Val	Ile; Leu

10 En el sentido dado arriba, son "funcionamente equivalentes" también los "precursores" de los polipéptidos descritos así como "derivados funcionales" y "sales" de los polipéptidos.

En ello, son "precursores" los predecesores naturales o sintéticos de los polipéptidos con o sin la actividad biológica deseada.

15 Bajo la expresión "sales" se entienden tanto sales de grupos carboxilo como también sales de adición ácida a grupos amino de la molécula de proteína acorde con la invención. Las sales de grupos carboxílicos pueden ser producidas en forma de por si conocida e incluyen sales inorgánicas como por ejemplo sales de sodio, calcio, amonio, hierro y zinc, así como sales con bases orgánicas, como por ejemplo aminas, como trietanolamina, arginina, lisina, piperidina y similares. Son asimismo objetivo de la invención sales de adición ácida, como por ejemplo sales con ácidos minerales, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos, como ácido acético y ácido oxálico.

20 "Derivados funcionales" de polipéptidos descritos pueden ser producidos así mismo sobre grupos laterales de aminoácidos funcionales o en sus extremos N- o C-terminales con ayuda de técnicas conocidas. Tales derivados abarcan por ejemplo ésteres alifáticos de grupos ácido carboxílicos, amidas de ácidos carboxílicos obtenibles mediante reacción con amoniaco o con una amina primaria o secundaria; N-acil derivados de grupos amino libres producidos mediante reacción con grupos acilo; u O-acil derivados de grupos hidroxil libres producidos por reacción con grupos acilo.

En el caso de una posible glicosilación de la proteína, los "funcionamente equivalentes" abarcan proteínas del tipo arriba definido en forma desglucosilada o bien glicosilada así como formas modificadas obtenibles mediante el cambio del modelo de glicosilación.

30 Los "funcionamente equivalentes" abarcan naturalmente polipéptidos que son accesibles a partir de otros organismos así como variantes que se encuentran de modo natural. Por ejemplo mediante comparación de secuencias se determinan segmentos de regiones de secuencias homólogas y basados en los objetivos concretos de la invención se determinan enzimas equivalentes.

"Funcionamente equivalentes" abarcan así mismo fragmentos, preferiblemente dominios o motivos de secuencia individuales del polipéptido descrito, que exhiben la función biológica deseada.

35 Además son "funcionamente equivalentes" proteínas de fusión que exhiben una de las secuencias de polipéptido arriba mencionadas o funcionamente equivalentes derivados de ellas y por lo menos otra secuencia heteróloga, funcionalmente diferente de ella, en unión funcional terminal en N o C (es decir sin interferencia recíproca esencialmente funcional de la parte de proteína de fusión). Ejemplos no limitantes de tales secuencias heterólogas son por ejemplo péptidos de señal o enzimas.

40 "Funcionamente equivalentes" son homólogos a las proteínas manifestadas concretamente. Éstos poseen una homología de por lo menos 60 %, preferiblemente por lo menos 75% particular menos 85 %, como por ejemplo 90%, 95%, 97% o 99% a una de las secuencias de aminoácidos manifestadas concretamente, calculado según el algoritmo de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448. Una homología porcentual de un polipéptido homólogo descrito significa en particular identidad porcentual del aminoácido residual referida a la longitud total de una de las secuencias de aminoácidos descritas aquí concretamente.

Pueden generarse homólogos a los polipéptido o proteínas descritos mediante mutagénesis, por ejemplo mediante mutación puntual o acortamiento de la proteína.

50 Pueden identificarse homólogos de la proteína descrita mediante tamizaje combinatorio de bancos de mutantes, como por ejemplo mutantes de acortamiento. Por ejemplo puede generarse un variopinto banco de variantes de proteína mediante mutagénesis combinatoria en planos de ácido nucleico, como por ejemplo mediante ligado enzimático de una

- mezcla de nucleótidos sintéticos. Existe una multiplicidad de métodos que pueden ser empleados para la producción de bancos de homólogos potenciales a partir de una secuencia degenerada de oligonucleótidos. La síntesis química de una secuencia degenerada de genes puede ser llevada a cabo en un equipo automático de síntesis de ADN, y el gen sintético puede ser ligado entonces en un vector adecuado de expresión. El empleo de una secuencia degenerada de gen hace posible la puesta a disposición de secuencias completas en una mezcla, la cual codifica la frase deseada en secuencias potenciales de proteína. El experto conoce métodos para la síntesis de oligonucleótidos degenerados (por ejemplo Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).
- En el estado de la técnica se conocen varios métodos para el tamizaje de productos de gen de bancos combinatorios, los cuales habían sido producidos mediante mutaciones de punto o acortamiento, y para el tamizaje de bancos de cADN en productos de gen con una propiedad elegida. Estas técnicas se adaptan al rápido tamizaje de los bancos de gen, los cuales han sido generados mediante mutagénesis combinatoria de homólogos acordes con la invención. Las técnicas empleadas más frecuentemente para el tamizaje de grandes bancos de gen, que están sujetos a un análisis con alto rendimiento, abarcan la clonación del banco de gen en vectores replicables de expresión, transformación de las células adecuadas con los bancos resultantes de vectores y expresión de los genes combinatorios bajo condiciones, bajo las cuales la verificación de la actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto fué verificado. Para identificar homólogos puede emplearse la Recursive-Ensemble-Mutagenese (REM), una técnica que incrementa la frecuencia en bancos de mutantes funcionales en combinación con las pruebas de tamizaje (Arkin y Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).
- Otras modificaciones de las secuencias descritas de ácidos nucleicos que codifican
- Se describen en particular secuencias de ácidos nucleicos (secuencias de ADN y ARN de cuerda sencilla y cuerda doble, como por ejemplo cADN y mARN), los cuales codifican para una enzima con la actividad descrita de deshidrogenasa. Preferiblemente son secuencias de ácidos nucleicos, las cuales por ejemplo codifican para secuencias de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6 o figura 3 o secuencias parciales características de ellos, o abarcan secuencias de ácidos nucleicos según SEQ ID NO: 3 o 5 o secuencias parciales características de ellos.
- Todas las secuencias de ácidos nucleicos aquí enumeradas son obtenibles en forma de por sí conocida mediante síntesis química a partir de los bloques constituyentes de nucleótidos, como por ejemplo mediante condensación de fragmentos de bloques constituyentes de nucleótidos individuales complementarios de la doble hélice que se traslapan. La síntesis química de oligonucleótidos puede ocurrir por ejemplo de forma conocida según el método de la fosfoamidita (Voet, Voet, 2a edición, Wiley Press New York, páginas 896-897). En Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press se describe la unión de oligonucleótidos sintéticos y llenado de brechas con ayuda del fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa y reacciones de ligado así como métodos generales de clonado.
- También se describen secuencias de ácidos nucleicos (secuencias de ADN y ARN de cuerda sencilla y cuerda doble, como por ejemplo cADN y mARN), que codifican para uno de los polipéptidos de arriba y sus equivalentes funcionales, los cuales están disponibles por ejemplo por empleo de nucleótidos análogos sintéticos.
- La invención describe tanto moléculas aisladas de ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos o proteínas acordes con la invención o fragmentos de ellos biológicamente activos, como también para fragmentos de ácido nucleico que pueden ser empleados por ejemplo como sondas de hibridación o cebadores para la identificación o amplificación de ácidos nucleicos que codifican de acuerdo con la invención.
- Las moléculas de ácidos nucleicos pueden además contener secuencias no traducidas de extremos 3'- y/o 5' de la sección del gen que codifica.
- La invención describe además las moléculas de ácido nucleico complementarias a las secuencias de nucleótidos descritas concretamente, o un corte de ellas.
- Las secuencias de nucleótidos hacen posible la generación de sondas y cebadores que son aplicables en otros tipos de células y organismos para la identificación y/o clonación de secuencias homólogas. Tales sondas o cebadores incluyen usualmente un rango de secuencia de nucleótidos que hibridan bajo condiciones "estrictas" (ver abajo) en por lo menos aproximadamente 12, preferiblemente por lo menos aproximadamente 25, como por ejemplo aproximadamente 40, 50 o 75 nucleótidos sucesivos de una cuerda en sentido o una correspondiente cuerda anti-sentido de una secuencia descrita de ácido nucleico.
- Una molécula de ácido nucleico "aislada" es separada de otras moléculas de ácido nucleico, que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico y puede además estar esencialmente libre de otros materiales celulares o medios de cultivo cuando es producida mediante técnicas recombinantes, o estar libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando es sintetizada por vía química.
- Una molécula de ácido nucleico puede ser aislada por medio de técnicas estándar de biología molecular y de la puesta a disposición de información sobre la secuencia. Por ejemplo puede aislarse cADN a partir de un banco adecuado de cADN, en lo cual se emplean como sondas de hibridación y técnicas estándar de hibridación una de las secuencias

completas manifestadas concretamente o un corte de ellas (como se describe por ejemplo en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Además mediante reacción en cadena de polimerasa puede aislarse una molécula de ácido nucleico que incluye una de las secuencias manifestadas o un corte de ella, donde se emplea el cebador de oligonucleótido, el cual había sido construido sobre la base de estas secuencia. El ácido nucleico así amplificado puede ser clonado sobre un vector adecuado y ser caracterizado mediante análisis de secuencia de ADN. Los oligonucleótidos pueden ser producidos además mediante métodos estándar de síntesis, por ejemplo con un equipo automático de síntesis de ADN.

En principio, las secuencias de ácidos nucleicos pueden ser aisladas e identificadas a partir de todos los organismos. De modo ventajoso, se aíslan las secuencias de ácido nucleico o los homólogos de ellas a partir de hongos, levaduras o bacterias. Como bacterias se mencionan las gram-negativas y gram-positivas. Preferiblemente se aíslan los ácidos nucleicos por métodos conocidos por los expertos, de bacterias gram negativas, ventajosamente de alfa-proteobacterias, beta-proteobacterias o gamma-proteobacterias, de modo particularmente preferido a partir de bacterias de las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae o Rhizobiaceae, muy particularmente preferido de bacterias del género *Agrobacterium*, *Pseudomonas* o *Burkholderia*.

Se aíslan secuencias de ácidos nucleicos por ejemplo con métodos comunes de hibridización o la técnica PCR, a partir de otros hongos o bacterias, por ejemplo de bancos genómicos o de cADN. Estas secuencias de ADN hibridizan bajo condiciones estándar con las secuencias descritas. Para la hibridización se emplean ventajosamente oligonucleótidos cortos del rango conservado por ejemplo del centro activo, los cuales pueden ser determinados por comparación con una deshidrogenasa en la forma conocida por el experto. Para la hibridización pueden emplearse también fragmentos largos de los ácidos nucleicos descritos o las secuencias completas. Dependiendo del ácido nucleico empleado (oligonucleótido, fragmento largo o secuencia completa) o dependiendo de cuál tipo de ácido nucleico ADN o ARN se emplee para la hibridización, varían éstas condiciones estándar. De este modo por ejemplo las temperaturas de fundido para híbrido ADN:ADN están aproximadamente 10 °C por debajo de las de híbrido ADN:ARN de la misma longitud.

Se entiende por condiciones estándar por ejemplo, dependiendo del ácido nucleico, temperaturas entre 42 y 58 °C en una solución tampón acuosa con una concentración entre 0,1 a 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM de citrato de sodio, pH 7,2) o adicionalmente en presencia de 50% de formamida como por ejemplo 42 °C en 5 x SSC, 50% de formamida. De modo ventajoso las condiciones de hibridización para híbrido ADN:ADN están en 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 20 °C a 45 °C, preferiblemente entre aproximadamente 30 °C a 45 °C. Para híbridos ADN:ARN las condiciones de hibridización están ventajosamente en 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 30 °C a 55 °C, preferiblemente entre 45 °C a 55 °C. Estas temperaturas indicadas para la hibridización son por ejemplo valores calculados de temperatura de fundido para un ácido nucleico con una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos y un contenido G + C de 50 % en ausencia de formamida. Las condiciones experimentales para la hibridización de ADN son descritas en los libros relevantes de enseñanza de genética, como por ejemplo Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, y se calculan según fórmulas conocidas por los expertos por ejemplo dependiendo de la longitud del ácido nucleico, del tipo de híbrido o del contenido G + C. Informaciones adicionales para la hibridización pueden ser tomadas por el experto de los siguientes libros de enseñanza: Ausubel et al. (eds), 1985, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York; Hames ADN Higgins (eds), 1985, *Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Se describen también derivados de las secuencias de ácido nucleico manifestadas concretamente o derivables.

De este modo otras secuencias de ácido nucleico pueden derivarse por ejemplo de SEQ ID NO:3 o 5 y diferenciarse de ella mediante adición, sustitución, inserción o borrado de nucleótidos individuales o varios nucleótidos, pero además codificar para polipéptidos con el perfil deseado de propiedades.

Se describen también tales secuencias de ácido nucleico que incluyen las denominadas mutaciones mudas o que de modo correspondiente al uso de codón de un organismo originario o patron, están cambiados en comparación con una secuencia mencionada concreta, así mismo como variantes que se encuentran naturalmente, como por ejemplo variantes de empalme o variantes de alelo.

Se describen así mismo secuencias obtenibles mediante sustituciones de nucleótidos que conservan (es decir los aminoácidos en cuestión son reemplazados por un aminoácido de igual carga, tamaño, polaridad y/o solubilidad).

Se describen también las moléculas derivadas mediante polimorfismos de secuencias de los ácidos nucleicos manifestados concretamente. Estos polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población debido a las variaciones naturales. Estas variaciones naturales causan comúnmente una varianza de 1 a 5 % en la secuencia de nucleótido de un gen.

Se entiende por derivados de una secuencia de ácido nucleico descrita por ejemplo variantes de alelo, que exhiben una homología de por lo menos 40 % sobre el plano derivado de aminoácido, homología de preferiblemente por lo menos 60 %, muy particularmente preferido homología de por lo menos 80, 85, 90, 93, 95 o 98 % sobre el rango total de

secuencia (respecto a homología sobre el nivel de aminoácido, se remite a las observaciones de arriba de los polipéptidos). Sobre los rangos parciales de las secuencias, las homología pueden de modo ventajoso ser más altas.

5 Además se entienden por derivados también homólogos de las secuencias descritas de ácidos nucleicos, por ejemplo homólogos fúngicos o bacterianos, secuencias acortadas, ADN o ARN de cuerda sencilla de la secuencia de ADN codificante y no codificante. Ellos poseen por ejemplo en el plano de ADN una homología de por lo menos 40 %, preferiblemente de por lo menos 60 %, particularmente preferido de por lo menos 70 %, muy particularmente preferido de por lo menos 80 % sobre el rango total indicado de ADN.

10 Además se entienden por derivados por ejemplo fusiones como promotores. Los promotores, que están conectados a las secuencias indicadas de nucleótidos, pueden cambiar mediante uno o varios intercambios de nucleótidos, inserciones, inversiones y/o borrados sin que se afecte negativamente la funcionalidad o bien la eficacia de los promotores. Además, mediante modificación de su secuencia los promotores pueden aumentar su eficacia o pueden también cambiar completamente organismos extraños mediante promotores efectivos.

15 Se entiende por derivados también variantes cuya secuencia de nucleótidos ha sido cambiado en el rango de -1 a -1000 bases corriente arriba antes del codón de inicio o 0 a 1000 bases corriente abajo después del codón de parada, de modo que la expresión del gen y/o la expresión de proteína cambia, preferiblemente aumenta.

20 Además la invención describe también secuencias de ácidos nucleicos, que hibridizan bajo "condiciones estrictas" con las secuencias codificantes arriba mencionadas. Se entiende por esta propiedad la capacidad bajo condiciones estrictas de un poli- uoligonucleótido para enlazar a una secuencia casi complementaria, mientras que bajo estas condiciones permanecen inmodificadas las uniones no específicas entre asociados no complementarios. Para ello, las secuencias deberían ser complementarias en 70-100%, preferiblemente en 90-100%. La propiedad de secuencias complementarias de poderse enlazar específicamente una junto a otra, se aprovecha por ejemplo en las técnicas Northern- o Southern- Bloto o en el enlace de cebador en PCR o RT-PCR. Para ello se emplean comúnmente oligonucleótidos desde una longitud de 30 pares de bases. Por condiciones estrictas se entiende por ejemplo en la técnica Northern-Blot, el empleo de una solución de lavado caliente a 50 - 70 °C, preferiblemente 60 - 65 °C, por ejemplo tampón 0,1 x SSC con 0, 1 % SDS (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M de citrato de sodio, pH 7,0) para la elución de sondas de cADN uoligonucleótidos hibridados de modo no específico. Para ello, como se mencionó arriba, permanecen unidos uno a otro solo ácidos nucleicos complementarios en gran medida. El ajuste de condiciones estrictas es conocido por los expertos y es descrito por ejemplo en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

30 Estos polinucleótidos se localizan en el barrido de bancos genómicos o de cADN y dado el caso se multiplican de allí con cebadores adecuados por medio de PCR y se aíslan a continuación por ejemplo con sondas adecuadas. Además, los polinucleótidos pueden ser sintetizados también por vías químicas.

Modificaciones de las estructuras

35 Se describen además fragmentos de expresión que contienen bajo los controles genéticos, secuencias reguladoras de ácidos nucleicos de una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido acorde con la invención, así como vectores que incluyen por lo menos uno de éstos fragmentos de expresión.

Preferiblemente tales fragmentos descritos incluyen un promotor 5' corriente arriba de la respectiva secuencia que codifica y una secuencia de terminación 3' corriente abajo, así como dado el caso otros elementos reguladores comunes, y concretamente en cada caso uniones operativas con la secuencia que codifica.

40 Se entiende por una "unión operativa" el arreglo secuencial de promotor, secuencia que codifica, terminador y dado el caso otros elementos reguladores de modo que cada uno de los elementos reguladores satisface según lo esperado su función en la expresión de la secuencia que codifica. Son ejemplos de secuencias enlazables de modo operativo las secuencias que tienen objetivo así como los potenciadores, señales de poliadenilación y similares. Otros elementos reguladores incluyen marcadores seleccionables, señales de amplificación, fuentes de replicación y similares. Por ejemplo en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) se describen secuencias reguladoras adecuadas.

45 En particular, se entiende por un fragmento descrito de ácidos nucleicos, aquellos en los que el gen de una deshidrogenasa descrita esta enlazado de modo operativo o funcional con una o varias señales de regulación para el control, por ejemplo aumento, de la expresión del gen.

50 Adicionalmente a estas secuencias de regulación, pueden aún estar presentes las regulaciones naturales de estas secuencias antes de los verdaderos genes de estructura y dado el caso pueden haber sido cambiados genéticamente de manera que se desconectó la regulación natural y se elevó la expresión del gen. El fragmento de ácidos nucleicos puede también ser construido de manera sencilla, es decir no se insertó adicionalmente ninguna señal adicional de regulación antes de la secuencia que codifica y no se eliminó el promotor natural con su regulación. En lugar de ello muta la secuencia natural de regulación de modo que no ocurre más ninguna regulación y se incrementa la expresión del gen.

5 Un fragmento preferido de ácidos nucleicos contiene de modo ventajoso también una o varias de las ya mencionadas secuencias "potenciadoras", enlazadas funcionalmente con el promotor lo cual hace posible una elevada expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. También en el extremo 3' de las secuencias de ADN pueden insertarse adicionalmente de modo ventajoso secuencias, como otros elementos reguladores o terminadores. Los ácidos nucleicos acordes con la invención pueden estar presentes en la fragmento en una o varias copias. En el fragmento pueden estar presentes aún otros marcadores, como genes complementarios de resistencia a los antibióticos o auxotrofismo, dado el caso para la selección del fragmento.

10 De modo ventajoso las secuencias de regulación para el método acorde con la invención están presentes por ejemplo en promotores como *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacI^q*, T7-T5-, T3-, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *rhaP* (*rhaP_{BAD}*)SP6-, λ -P_R o en promotor λ -P_L, los cuales encuentran aplicación de modo ventajoso en bacterias gram-negativas. Otras secuencias reguladoras ventajosas están presentes por ejemplo en los promotores grampositivos *amy* y *SPO2*, en los promotores de hongos o levaduras *ADC1*, *MFalfa*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH*. En esta relación son también ventajosos los promotores de la piruvatodescarboxilasa y de la metanoloxidasa, por ejemplo de *Hansenula*. Para la regulación pueden emplearse también promotores artificiales para la regulación.

15 Para la expresión, el fragmento de ácidos nucleicos se inserta en un organismo hospedante, de modo ventajoso en un vector como por ejemplo un plásmido o un fago, lo cual hace posible una expresión óptima del gen en el hospedante. Se entiende por vectores, aparte de plásmidos y fagos, también todos los otros vectores conocidos por los expertos, por consiguiente por ejemplo virus como SV40, CMV, Baculovirus y Adenovirus, transposons, elementos IS, fásmidos, cósmidos, y ADN lineales o circulares. Estos vectores pueden replicar de modo autónomo en organismos hospedantes o replicar por vía cromosómica. Estos vectores representan otra modalidad de la invención. Por ejemplo son plásmidos adecuados en *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pKK223-3, pDHE19.2, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, Igt11 o pBdCl, en *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 o pIJ361, en *Bacillus* pUB110, pC194 o pBD214, en *Corynebacterium* pSA77 o pAJ667, en hongos pALS1, pIL2 o pBB116, en levaduras 2alphaM, pAG-1, YEp6, YEp13 o pEMBLYe23 o en plantas pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004 o pDH51. Los plásmidos mencionados representan una pequeña selección de los plásmidos posibles. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos y pueden tomarse por ejemplo del libro *Cloning Vectors* (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

25 Para la expresión de los otros genes presentes, el fragmento de ácidos nucleicos contiene modo ventajoso adicionalmente aún secuencias reguladoras 3'- y/o 5'-terminales para el aumento de la expresión, las cuales para una óptima expresión son elegidas dependiendo del organismo hospedante escogido y gen o genes.

30 Estas secuencias reguladoras deberían hacer posible la acertada expresión de los genes y de la expresión de la proteína. Dependiendo del organismo hospedante, esto puede por ejemplo significar que el gen está expresado o sobreexpresado sólo después de la inducción o que es expresado y/o sobreexpresado inmediatamente.

35 En ello, las secuencias o bien factores reguladores preferiblemente pueden influir positivamente y con ello aumentar la expresión del gen de los genes introducidos. De éste modo puede ocurrir ventajosamente un fortalecimiento de los elementos reguladores sobre los planos de transcripción, en lo cual se emplean fuertes señales de transcripción como promotores y/o "potenciadores". Además también es posible un fortalecimiento de la traducción, en lo cual por ejemplo mejorar la estabilidad del mRNA.

40 En otra modalidad del vector, puede también introducirse de modo ventajoso en los microorganismos el vector que contiene el fragmento de ácidos nucleicos o el ácido nucleico en forma de un ADN lineal integrarse por recombinación heteróloga u homóloga en el genoma del organismo hospedante. Este ADN lineal puede consistir en un vector transformado en lineal como un plásmido o sólo consistir en el fragmento de ácidos nucleicos o el ácido nucleico acorde con la invención.

45 Para una expresión óptima de genes heterólogos en organismos, es ventajoso cambiar las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes al "uso de codón" específico empleado en el organismo. Se determina fácilmente el "uso de codón" mediante valoración por computador de otros genes conocidos del organismo en cuestión.

50 La producción de una cinta de expresión ocurre mediante la fusión de un promotor adecuado con una secuencia adecuada que codifica así como con una señal de terminación o de poliadenilación. Para ello se emplean técnicas comunes de recombinación y clonación, como por ejemplo se describen en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) así como en T.J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. ADN Wiley Interscience (1987).

55 Para la expresión en un organismo hospedante, el fragmento de ácido nucleico o bien fragmento de gen recombinantes son insertados de modo ventajoso en un vector específico del hospedante, lo cual hace posible una óptima expresión del gen en el hospedante. Los vectores son bien conocidos por los expertos y pueden tomarse por ejemplo de "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsq, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985).

Organismos hospedantes utilizables

5 Los microorganismos recombinantes son producidos con ayuda de los vectores o fragmentos descritos, los cuales se transforman por ejemplo con por lo menos un vector acorde con la invención y pueden ser empleados para la producción de los polipéptidos acordes con la invención. De modo ventajoso se introducen y expresan los fragmentos recombinantes descritos arriba en un sistema hospedante adecuado. En ello se emplean preferiblemente métodos comunes de clonación y transfección conocidos por los expertos, como por ejemplo co-precipitación, fusión de corto plazo, electroporación, transfección retroviral y similares, para llevar los ácidos nucleicos mencionados a la expresión en los respectivos sistemas de expresión. Por ejemplo se describen sistemas adecuados en Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, o Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

10 También son producibles microorganismos recombinados de modo homólogo. Para ello se produce un vector que contiene por lo menos un corte de un gen o una secuencia codificante acordes con la invención, donde dado el caso se ha introducido, por lo menos un borrado, adición o sustitución de aminoácidos para cambiar, por ejemplo para disrumir de modo funcional (vector "Knock-out"), la secuencia descrita. La secuencia introducida puede por ejemplo ser también un homólogo de un microorganismo pariente o derivarse de una fuente de mamífero, levadura o insecto. El vector empleado para la recombinación homóloga puede ser alternativamente modificado de modo que el gen endógeno muta en recombinación homóloga o es modificado de otro modo, aunque aún codifica la proteína funcional (por ejemplo puede cambiarse el rango regulatorio ubicado corriente arriba de modo que a través de ello cambia la expresión de la proteína endógena). El corte cambiado del gen acorde con la invención esta en el vector homólogo de recombinación. En Thomas, K.R. y Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503 se describe la construcción de vectores adecuados para la recombinación homóloga.

15 Como organismos hospedantes recombinantes para el ácido nucleico descrito o el fragmento de ácidos nucleicos, entran en principio en consideración todos los organismos procarióticos o eucarióticos. De modo ventajoso se emplean como organismos hospedantes organismos como bacterias, hongos o levaduras. De modo ventajoso se emplean bacterias gram-positivas o gram-negativas, preferiblemente bacterias de las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Streptomycetaceae o Nocardiaceae, particularmente preferido bacterias de los géneros Escherichia, Pseudomonas, Streptomyces, Nocardia, Burkholderia, Salmonella, Agrobacterium o Rhodococcus. Se prefiere muy particularmente el género y tipo Escherichia coli. Otras bacterias ventajosa se encuentran además en el grupo de las alfa-proteobacterias, beta-proteobacterias o gamma-proteobacterias.

20 En ello el organismo hospedante o los organismos hospedantes contienen preferiblemente por lo menos una de las secuencias de ácidos nucleicos, fragmentos de ácidos nucleicos o vectores descritos en esta invención, los cuales codifican para una enzima con actividad de deshidrogenasa acorde con la invención.

25 Los organismos empleados en el método acorde con la invención son criados o cultivados en formas conocidas por el experto, dependiendo del organismo hospedante. Los microorganismos son cultivados por regla general en un medio líquido, que contiene una fuente de carbono principalmente en forma de azúcares, una fuente de nitrógeno principalmente en forma de fuentes de nitrógeno orgánico como extracto de levadura o sales como sulfato de amonio, elementos traza como sales de hierro, manganeso, magnesio y dado el caso vitaminas, a temperaturas entre 0 °C y 100 °C, preferiblemente entre 10 °C a 60 °C bajo aplicación de oxígeno gaseoso. En ello puede mantenerse el pH del líquido nutritivo a un valor fijo, es decir ser regulado o no durante la propagación. La propagación puede ocurrir en forma de "lotes", forma de "semi lote" o continua. Las sustancias nutritivas pueden estar presentes al comienzo de la fermentación o ser alimentadas en forma semi continua o continua. La cetona puede ser añadida directamente a la propagación o de modo ventajoso después de la propagación. Según el método descrito en los ejemplos, las enzimas pueden ser aisladas de los organismos o ser empleadas como extracto crudo para la reacción.

30 Producción recombinante de los polipéptidos descritos

Se describen además métodos para la producción recombinante de polipéptidos acordes con la invención o fragmentos funcionales, biológicamente activos de ellos, donde se cultiva un microorganismo que produce polipéptidos, dado el caso se induce la expresión del polipéptido y se aísla éste del cultivo. En caso de desearse, los polipéptidos pueden producirse de este modo también a escala industrial.

35 El microorganismo recombinante puede ser cultivado y fermentado según métodos conocidos. Las bacterias pueden ser multiplicadas por ejemplo en medio TB o LB y a una temperatura de 20 a 40°C y un valor de pH de 6 a 9. Por ejemplo en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) se describen en detalle las condiciones adecuadas de cultivo.

40 Las células son entonces desintegradas, en caso de que los polipéptidos no sean secretados en el medio de cultivo, y se recupera el producto del lisado según métodos conocidos de aislamiento de proteína. Ocasionalmente, las células pueden ser desintegradas mediante ultrasonido de alta frecuencia, mediante alta presión, como por ejemplo en una celda de presión, mediante osmólisis, mediante la acción de detergentes, enzimas líticas o solventes orgánicos, mediante homogeneizadores o mediante combinación de varios de los métodos enumerados.

5 Puede lograrse una purificación de los polipéptidos con métodos cromatográficos conocidos, como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), como cromatografía en Q-Sepharosa, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrofóbica, así como con otros métodos comunes como ultrafiltración, cristalización, precipitación mediante sales, diálisis y electroforesis nativa en gel. Por ejemplo en Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, editorial Walter de Gruyter, Berlin, New York o en Scopes, R., Protein Purification, editorial Springer, Nueva York, Heidelberg, Berlin se describen métodos adecuados.

10 Para el aislamiento de la proteína recombinante puede ser ventajoso emplear sistemas de vectores u oligonucleótidos, los cuales alargan el cADN en determinadas secuencias de nucleótidos y con ello codifican para polipéptidos o proteínas de fusión cambiados, lo cual sirve por ejemplo para una purificación más sencilla. Tales modificaciones adecuadas son por ejemplo denominadas "Tags" que funcionan como anclas, como por ejemplo la modificación o epítipo conocida como ancla hexa-histidina, las cuales pueden ser reconocidas como antígenos de anticuerpos (descritos por ejemplo en Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Estas anclas pueden servir para la unión de las proteínas a un soporte sólido, como por ejemplo una matriz de polímero, la cual por ejemplo puede ser llenada en una columna cromatográfica, o en una placa de microtitulación en otro soporte.

15 Al mismo tiempo pueden emplearse estas anclas también para el reconocimiento de las proteínas. Para el reconocimiento de las proteínas pueden además emplearse marcadores comunes como colorantes de fluorescencia, marcadores de enzimas, los cuales después de la reacción con un sustrato forman un producto de reacción detectable, o marcadores radioactivos, solos o en combinación con las anclas para la formación del derivado de las proteínas.

20 Otras modificaciones para la ejecución del método de reducción enzimática acorde con la invención

Las deshidrogenasas pueden ser empleadas en el método acorde con la invención como enzima libre o inmovilizada.

El método acorde con la invención es ejecutado ventajosamente a una temperatura entre 0 °C a 95 °C, preferiblemente entre 10 °C a 85 °C, particularmente preferido entre 15 °C a 75 °C.

25 El valor de pH en el método acorde con la invención es mantenido ventajosamente entre pH 4 y 12, preferiblemente entre pH 4,5 y 9, particularmente preferido entre pH 5 y 8.

En el método acorde con la invención se entiende por enantiómeros puros o bien productos quirales, como 3-cloro-1-(1-tien-2-il)-(S)-propan-1-ol, enantiómeros que muestran un enriquecimiento de enantiómeros. Preferiblemente en el método se alcanzan purezas de enantiómero de por lo menos 70 %ee, preferiblemente de por lo menos 80 %ee, particularmente preferido de por lo menos 90 %ee, muy particularmente preferido de por lo menos 98 %ee.

30 Para el método acorde con la invención pueden emplearse células en crecimiento, que contienen los ácidos nucleicos, fragmentos de ácidos nucleicos o vectores acordes con la invención. También se emplean células en reposo o desintegradas. Por células desintegradas se entienden por ejemplo aquellas que han sido convertidas en porosas por un tratamiento con, por ejemplo, solventes o células que fueron rotas por un tratamiento enzimático, por un tratamiento mecánico (por ejemplo celda de presión o ultrasonido) u otro método. Los extractos crudos así obtenidos son ventajosamente adecuados para el método acorde con la invención. Para el método también pueden emplearse enzimas purificadas o depuradas. Así mismo son adecuados enzimas o microorganismos inmovilizados, que pueden encontrar ventajosamente aplicación en la reacción.

El método acorde con la invención puede ser operado en forma de lote, en semi-lote o de forma continua.

40 La ejecución del método puede ocurrir ventajosamente en bioreactores, como por ejemplo se describen en Biotechnology, volumen 3, 2a edición, Rehm et al Hrsg., (1993) en particular capítulo II.

Los siguientes ejemplos deben ilustrar la invención, sin embargo sin limitarla. Se hace aquí referencia a las figuras acompañantes, que muestran en ello:

45 Figura 1 el gel coloreado por actividad de una deshidrogenasa Lu10288 de acuerdo con la invención; huella 1: estándar de peso molecular debajo de: 47 kDa, 74 kDa, 121 kDa, 205 kDa; huella 2: vacío; huella 3: sobrenadante homogenizado; huella 4: fracción de valor Q-sefarosa; huella 5: fracción de valor Q-sefarosa (triple cantidad); huella 6: fracción de valor Superdex; huella 7: fracción de valor mono-Q; huella 8: fracción de valor mono-P;

Figuras 2A y 2B un curso típico de la reacción de diferentes cargas para la producción de (S)-3-metilamino-1-(1-tien-2-il)-propan-1-ol I-S mediante reacción con una deshidrogenasa de Lactobacillus brevis.

50 Figura 3A el resultado de una secuenciación N-terminal de una banda Blot de deshidrogenasa de Lu10288 aislada de acuerdo con la invención; y Figura 3B los datos de secuencia de diferentes fragmentos proteolíticos de una deshidrogenasa de Lu10288 purificada de acuerdo con la invención; en tanto en varias señales por etapa de la secuencia fue observable una secuencia principal, se representa esto con doble subrayado. Las posiciones no legibles se caracterizan con "/"; para posiciones cuya determinación está afectada con alguna

incertidumbre, se indican los radicales aminoácidos en paréntesis. Dos aminoácidos están indicados en una posición cuando no puede indicarse ninguna preferencia clara. "?" significa un aminoácido desconocido o bien no determinable.

Ejemplos

5 A. Ejemplos químicos

Ejemplo 1: Producción de 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona III.1

10 Se colocaron 33 kg de tiofeno en 150 kg de dicloroetano y a continuación se añadieron 62,7 kg de tricloruro de aluminio. Se enfrió la mezcla de reacción a 10 °C y se añadieron 55 kg de cloruro de 3-cloropropionilo. Se agitó a continuación la mezcla a temperatura ambiente por 12 h. Los controles de CGy RMN mostraron que la mezcla de reacción, aún contenía aproximadamente 3-4 % mol de 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona y 3-cloro-1-(tien-2-il)-propanona formadas. Subsecuentemente se introdujo a temperatura ambiente 15 cloruro de hidrógeno por el tiempo necesario (aproximadamente 30 minutos) para que ya no se evidencie nada de propanona. A continuación se hidrolizó la mezcla de reacción mediante adición de 100 kg de agua desionizada. Después de la eliminación del solvente al vacío se obtuvieron como un aceite 65,7 kg (96 % de la categoría) del compuesto del título.

Ejemplo 2: Producción de 3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol I mediante reducción con borohidruro de sodio.

20 La propanona del ejemplo 1 fue colocada en una mezcla de 400 ml de tolueno y 200 g de metanol a 0 °C. Después de la adición de 2 g de una solución de hidróxido de sodio al 30% se añadieron 21,4 g borohidruro de sodio en porciones dentro de un período de 2,5 h. Después de agitar 40 min a 0 °C se añadieron a la mezcla de reacción 12,1 g de solución acuosa de metilamina al 40%. Se agitó la mezcla por 6 h a 60 °C bajo presión propia. Después del enfriamiento a temperatura ambiente se eliminó el solvente, se digirió el residuo con tolueno y se filtró de éste. Se secó el filtrado y se obtuvieron 175,8 g del compuesto del título en forma de una sustancia sólida amarillenta.

B. Ejemplos bioquímicos:

Ejemplo 3: Puesta a disposición de glucosa -deshidrogenasa para la regeneración del cofactor

25 Para la regeneración del cofactor se pudo emplear glucosa-deshidrogenasa de fuentes comerciales (por ejemplo Jülich Fine Chemicals orden-No. 22.10 o 19.10) o fuentes propias, donde era un clon de E.coli XL10 Gold pUC19, la cual contenía el gen de glucosa-deshidrogenasa de Bacillus subtilis (Genbank-Acc.No. M12276) (Lu11293).

Para la fermentación de E. coli Lu11293 se añadió el siguiente medio:

560 g	extracto de levadura (65 %)
448 g	Trypton (Difco)
42 g	KH ₂ PO ₄
84 g	Na ₂ HPO ₄
644 g	glicerina (99%)
100 mL	SL4 solución (5 veces)
1 g	Tegosipon 3062
	se completa el medio con hasta 13,5 L, el valor de pH
	se ajusta a 7,0, se toman aproximadamente 300 mL para cultivo previo,
	después se esteriliza por 30 min. a 122 °C.
	Se añade solución estéril de sal* (antes se toma la solución de sal para
	el agitador de recipientes, ver Rapport).

*Solución de sal: 2,1 g CaCl₂ * 2 H₂O
 3,5 g MgSO₄ * 7 H₂O
 14 g NH₄Cl
 + 14 mL solución de ampicilina (100 mg/mL)

5 disolver en 500 mL de agua y filtrar en filtro estéril.

En cada caso se esterilizaron 150 ml de medio en dos frascos Erlenmeyer de 1 L y se completó con 5 ml de solución estéril de sal. Después de inocular desde una placa de agar LB-ampicilina se incubaron los cultivos previos por 12 horas a 37 °C y 200 rpm y se añadieron al medio de fermentación. Se inicio la fermentación a 37°C, 0,1 bar de presión interior, pH 7,0 (ajuste con ácido fosfórico al 20% y 25% NaOH) con una tasa de introducción de gas de 7,5 L/min y 300 rpm (ajuste de la pO₂ entre 20 y 50% con 10-20 L/min de aire adicional y 500-1500 rpm). Después de 2 h se añadió para la inducción IPTG 0,1 mM y después de en total 13 h terminó la fermentación. Después de retirar y lavar las células (1,3 kg) se almacenaron estas hasta el empleo (2-20 g/L en carga) a -20°C.

10

Ejemplo 4: Tamizaje de deshidrogenasas para la producción de 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona

15

a) Se cultivaron diferentes cepas de bacterias y hongos (predominantemente de diferentes colecciones de cepas) por 24 a 48 h en 20 ml de medio LB, medio MRS(compañía Difco) o medio GYP (empleado para levaduras) (1 % p/v de D-glucosa, en cada caso 0.5 % p/v de extracto de levadura y polipeptona, pH 6.0) a 30 o 37°C, se lavaron en Tris-HCl 3mM pH7.5 y se resuspendieron en 2 ml de tampón. Se disgregó una alícuota con 1 vol. de esferas de vidrio (diámetro de 0,3-0,5mm) molino y (3x5 min con enfriamiento intermedio por 10 min en hielo). Después de la separación de la turbidez mediante centrifugación (5 min 14000 r/min 4°C) se obtuvo un extracto cudo claro. A continuación se probó la actividad reductora sobre 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona del ejemplo, de las suspensiones de células y extracto crudo.

20

Prueba de aplicación:

150 µl células/extracto crudo

50 µl 1 M solución de glucosa

50 µl glucosa-deshidrogenasa (12-15 U/µl; 20-200 mg BFM/ml) del ejemplo 3

25

50 µl 2 mM NADH

50 µl 2 mM NADPH

10 µl 0,5 M 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-on en metanol

190 µl MES 50 mM pH 6,0 o tris-HCl pH 7,5

30

La incubación ocurrió a 30 °C. Se detuvo el tiempo de las muestras (200 µl) con 3 µl HCl conc. después de 1, 2 o 24 h. Después de la centrifugación se analizaron los sobrenadantes por HPLC buscando 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona y 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol (Chromolith Speed ROD, RP-18e 50 - 4,6mm, flujo 1,5 ml/min, 0,0 - 1,0 min: 35% acetonitrilo+ 65% tampón de 10mM KH₂PO₄ pH 2,5; 1,1 - 1,3 min: 80% acetonitrilo + 20% tampón 10mM KH₂PO₄ pH 2,5; 1,3 - 2,0 min: 35% acetonitrilo + 65% tampón 10mM KH₂PO₄ pH 2,5; detección a 230 nm (alcohol) y 260 nm (cetona) a un tiempo de retención Tr = 1,250 min (3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol) y Tr = 1,500 min (3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona); eventuales subproductos de la eliminación de HCl (1-tien-2-il-propen-1-ona y 1-tien-2-il-propen-1-ol) a Tr = 0,971 min y Tr = 1,165 min).

35

Los géneros elegidos fueron probados repetidamente, donde para la determinación del exceso de enantiómero (ee) se extrajeron las muestras con metil-tert.-butiléter (MTBE) o metilisobutilcetona (MIBK) y fueron caracterizados por análisis CG o HPLC quiral. Para ello se emplearon los siguientes métodos: CG: Hydrodex-β-6-TBDM, 25 m, 90°C 10min 5°C/min 180°C 10min, duración: 38 min, entradas: calentador: 200°C, presión: 106.8 kPa, flujo total: 102 ml/min, relación de división: 125:1, división de flujo: 99.8 ml/min, detector: 200°C o bien HPLC: Chiracel OD-H, 250*4,6mm (Daicel), 40°C, flujo 1,0 ml/min, 0,0 - 1,0 min: 97,5% n-hexano +2,5% isopropanol; detección a 230 nm (alcohol) y 260 nm (cetona) a Tr 9,50 (3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-on), Tr 16,60 min (R-3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol) y Tr 18,30 min (S-3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol).

45

b) se aislaron nuevamente diferentes géneros de Lactobacillus

Se aislaron los generous Lactobacillus brevis-Lu10288,10290 y 10291 como sigue.

b1) medios empleados

Medio de Kleymanns:

En 915ml se disolvieron las siguientes sustancias

10g/l Triptona (Difco-Becton Dickinson)

7g/l extracto de levadura (Difco-Becton Dickinson)

2g/l extracto de carne (Difco-Becton Dickinson)

5 5 g/l fructosa

2 g/l maltosa

3,6 g/l ácido glucónico 50%

1,9 g/l ácido cítrico*H₂O

5 g/l acetato

10 1 g/l Tween 80

0,2 g/l MgSO₄*7H₂O

0,05 g/l MnSO₄

0,01 g/l FeSO₄

0,4 g/l L-cisteína

15 1,25 ml NH₄OH 25%

Para los discos de agar: adición de 2% Bacto Agar (Difco-Becton Dickinson)

se ajustó el pH de la solución a 5,4.

Se autoclavó la solución 15' a 121°C.

20 Después del autoclavado se añadieron bajo agitación 50 ml de solución estéril de glucosa (5g ad 50 ml H₂O y 40ml de etanol) y se colocaron en placas de Agar.

Medio KMB:

10g/l triptona (Difco-Becton Dickinson)

7g/l extracto de levadura (Difco-Becton Dickinson)

2 g/l KH₂PO₄

25 1 g/l Tween 80

0,5 g/l MgSO₄*7H₂O

1 g/l MnSO₄

20g/l CaCO₃

10g/l glucosa

30 1,5% de agar para la producción de las placas de agar

se autoclavó la solución 15' a 121°C.

Se disolvieron por separado la glucosa y el CaCO₃ (Riedel de Haen) y se autoclavaron y se mezclaron antes de la colocación en las placas con el agar.

b2) Aislamiento de los microorganismos:

35 Se incubaron 5-10 g de ensilaje del área norte de Alemania (LUFA-Oldenburg) en un matraz Erlenmeyer de 50 ml en forma anaeróbica a 37 °C durante la noche con 20 ml salinos. Se inoculó la fracción líquida obtenida 1:100 en 50 ml de medio Kleymanns y se incubó anaeróticamente por 24h a temperatura ambiente y se agitó suavemente. Después se colocó la suspensión de células en las placas Kleymanns de selección descritas. Se incubaron las placas anaeróticamente por 48-72h a 37°C y se aislaron las colonias obtenidas mediante rayado repetido en medio KMB. La caracterización del género tuvo lugar en medio líquido KMB con 20 g/l de fructosa

40

(24 h 37°C, 50 rpm) mediante la determinación del patrón de fermentación ácida (medición de pH y determinación de la concentración de glucosa, fructosa, lactato, acetato, etanol por análisis HPLC del sobrenadante del cultivo). Se aislaron los géneros heterofermentativos con acetato y formación de lactato y se caracterizaron sistemáticamente por análisis del 16sARN.

5 c) Resultados del tamizaje

Las tablas 1,2 y 3 muestran a modo de ejemplo los géneros o bien rendimientos y valores ee.

Tabla 1

Número Lu	Género	Tipo	Colección	Número
44	Byssochlamys	fulva	IMI	163641
105	Geotrichum	candidum	ATCC	28747
106	Geotrichum	candidum	ATCC	20141
582	Pichia	glucozyma	ATCC	18938
716	Hansenula	polymorpha	-	
908	Saccharomyces	rouxi	IFO	493
1844	Kluyveromyces	lactis	ATCC	56498
2707	Saccharomyces	cerevisiae	ATCC	9080
3458	Geotrichum	candidum	ATCC	34614
896	Geotrichum	vanrij	ATCC	22375
897	Geotrichum	fermentans	ATCC	56301
3458	Geotrichum	klebahnii	ATCC	20001
4986	Candida	utilis	-	
8472	Candida	magnoliae	ATCC	12573
1821	Candida	guilliermondii	ATCC	20403
1823	Candida	guilliermondii	ATCC	20474
8478	Candida	tropicalis	ATCC	24887
8833	Rhodotorula	aurantiaca	ATCC	32770
127	Pseudomonas	desmolytica	NRRL	3108
404	Rhodococcus	fragi	IFO	12049
444	Pseudomonas	paucimobilis	ATCC	10829
493	Pseudomonas	citronellolis	ATCC	13674
4006	Pseudomonas	lemoinei	NCIMB	9947
8099	Burkholderia	gladioli	ATCC	25417
8510	Rhodococcus	ruber	DSMZ	8316
Número Lu	Género	Tipo	Colección	Número
10288	Lactobacillus	brevis	*	

ES 2 357 115 T3

10290	Lactobacillus	brevis	-*	
10291	Lactobacillus	brevis	-*	

Tabla 2 Rendimientos:

Número Lu	Género	Tipo	OD 600	Rendimiento 2h/mM	Rendimiento 24h/mM
44	Byssochlamys	Fulva	n.b.	0,0	0,2
105	Geotrichum	candidum	12,18	0,2	0,2
106	Geotrichum	candidum	7,8	3,1	4,1
582	Pichia	glucozyma	9,98	0,1	0,1
716	Hansenula	polymorpha	12,24	0,0	0,3
908	Saccharomyces	rouxi	8,78	0,0	0,3
1844	Kluyveromyces	lactis	13,86	0,0	0,3
2707	Saccharomyces	cerevisiae	10	0,2	0,4
3458	Geotrichum	candidum	8,26	0,2	0,4
896	Geotrichum	vanrij	11,36	0,03	n.b.
897	Geotrichum	fermentans	9,30	0,04	n.b.
3458	Geotrichum	klebahnii	10,84	0,08	n.b.
4986	Candida	Utilis	11,06	0,0	0,2
1821	Candida	guilliermondii	5,76	0,09	n.b.
1823	Candida	guilliermondii	5,54	0,07	n.b.
8472	Candida	Magnoliae	13,78	0,8	0,8
8478	Candida	Tropicalis	2,6	0,05	n.b.
8833	Rhodotorula	Aurantiaca	2,32	0,1	0,3
127	Pseudomonas	desmolytica	3,74	0,0	0,4
404	Rhodococcus	fragi	1,78	n.b.	0,3
493	Pseudomonas	citronellolis	3,54	n.b.	0,2
4006	Pseudomonas	lemoinei	2,24	n.b.	0,2
8099	Burkholderia	gladioli	15,34	0,1	0,2
8510	Rhodococcus	ruber	1,1	0,0	0,1
10288	Lactobacillus	brevis	4,89	0,2	0,4
10290	Lactobacillus	brevis	2,08	0,1	0,2
10291	Lactobacillus	brevis	2,84	0,2	0,2

n.b.; no determinado

Rendimientos referidos al 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol en mM

Tabla 3 Repetición de la prueba con determinación del valor ee

Número Lu	Género	Tipo	OD 600	Rendimiento 2h/mM	Valor ee 24 h/ %
10288	Lactobacillus	brevis	4,89	5,2	n.b.
105	Geotrichum	candidum	7,86	4,2	98
8472	Candida	Magnolia	6,56	0,13	56

Ejemplo 5: Purificación de la deshidrogenasa de Lactobacillus brevis

- 5 [0164] Para la fermentación de Lactobacillus brevis Lu10288 se añadió el siguiente medio:

1400 g	Extracto de levadura (65 %)
44,1 g	Acido citrico
63 g	KH ₂ PO ₄
21,5 g	MgSO ₄ * 7 H ₂ O
4,1 g	MnSO ₄ * H ₂ O
21 g	Tween 80
15,4 g	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ · 12 H ₂ O
1 g	Tegosipon 3062
	Completar el medio hasta 12,6 l, ajustar el valor de pH a 5,8, tomar aproximadamente 300 ml para cultivo previo; esterilización 30 min. a 122 °C; disolver 840 g glucosa +860 ml y esterilizar; a cada 15 ml de solución de glucosa añadir 135 ml de medio previo de cultivo en sendos matraces de 1L, el resto añadirlo a medio de fermentación.

Se inocularon 2 cultivos previos de placas de agar MRS, se incubaron 17 h a 37°C, 200 rpm y se añadieron al medio de fermentación. Se inició la fermentación a 37°C, 0,1 bar de presión interior, pH 5,8 con una tasa de introducción de gas de 1 l/min y 100 rpm (sin regulación de pO₂) y terminó después de 23 h a una OD600 de 14,8.

- 10 Se determinó la actividad de las muestras lavadas de células de forma análoga al ejemplo 4a) con células en reposo en MES, pH6.0.

La purificación de la deshidrogenasa de Lu10288 fue ejecutada como sigue:

Homogenización:

- 15 Se resuspendieron 100g de biomasa húmeda de Lu10288 (Lactobacillus brevis) en 5 x 20g porciones con 100ml de tampón MES, MgCl₂ 1mM, pH 7,1 y se homogeneizó en un molino de esferas con perlas de vidrio (diámetro 0,1 mm-0,2mm, 50ml de células resuspendidas en 50ml de perlas de vidrio) en 10 porciones por 20 minutos bajo enfriamiento con hielo a 4000rpm.

Se separaron las esferas de vidrio sobre un filtro de vacío de vidrio G2 y se lavaron con 20ml de tampón. Se clarificó el homogeneizado colectado entonces en un rotor GSA a 12000rpm por 20 minutos (610ml).

- 20 a) cromatografía de intercambio iónico en Q-Sefarosa:

Se equilibró una Q-Sefarosa de flujo rápido (Pharmacia) con un diámetro de 5cm y un volumen de 400 ml en tampón MES 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 6,8. A 610 ml de homogeneizado se añadieron 11 tabletas de Complete (mezcla de inhibidor de proteasa, Roche, Complete, libre de EDTA; Cat. No.:1873580) y se aplicaron a la columna de Q-Sefarosa a una velocidad de aplicación de 10ml/min. La detección a 280 nm. Después se lavó en el mismo tampón con tres volúmenes de la columna. Para la elución se ejerció un gradiente lineal de MES 20 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 1 M, pH 6,8 (en 100 minutos de 0% NaCl a 100% NaCl). Se colectaron fracciones de 10 ml y se probaron. La fracción 42 a 62 fue probada en HPLC buscando 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona activa.

25

b) Cromatografía de tamiz molecular Superdex:

Se equilibró una columna de tamiz molecular Superdex 200 (Pharmacia) con un diámetro de 2,6 cm y un volumen de 240 ml en MES 20 mM, MgCl₂ 1 mM, 1 tableta de Complete por litro de tampón (libre de EDTA), pH 7,1. Las fracciones de pico de la Q-Sefarosa fueron acumuladas (240ml) y se ajustó a 80% de saturación mediante lenta adición de 124 g de sulfato de amonio. Se mantuvo el pH en 7,1. Se agitó la solución por 10 minutos 4°C y después se centrifugó por 20 minutos a 12000 r/min. Las pellas obtenidas fueron resuspendidas en 5 ml de tampón equilibrante y se hizo diálisis por 1 hora a 4 grados Celsius (volumen de exclusión 10 kDa). Se dividió la solución dializada en dos partes de 9 ml y se aplicó a la columna de tamiz molecular a un flujo de 4ml por minuto. Se colectaron y probaron fracciones de 4 ml. Las fracciones 48 a 56 fueron nuevamente activas para ambos sustratos.

c) Cromatografía de intercambio iónico Mono-Q:

Se equilibró una columna preparativa Mono-Q HR (Pharmacia) con un volumen de 20 ml en MES 20 mM, MgCl₂ 1mM, pH 7,1. Se aplicaron 70 ml de las fracciones de pico colectadas del Superdex con una velocidad de flujo de 4 ml por minuto. Después del lavado de la columna, ésta fue desarrollada con un gradiente lineal en 100 minutos a 100% MES 20 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,1. Se recogieron fracciones de 4 ml. Las fracciones activas (fracción 36 a 41) fueron colectadas.

d) cromatografía de intercambio iónico Mono-P:

Se equilibró una columna Mono-P (Pharmacia, 4 ml) en MOPS 20 mM, MgCl₂ 1mM, pH 7,1. Se aplicaron 21 ml de las fracciones de picoMono-Q a un flujo de 0,75 ml/min. Después del lavado hasta la línea base se aplicó un gradiente lineal en n 100 minutos a 100% MOPS 20 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,1. Se recogieron fracciones de (0,75ml). Se reunieron las fracciones activas (34-39).

Actividad de tinción en geles:

Se diluyeron las muestras con un volumen igual de Novex tampon de muestras (Novex)"tris-glicina nativa". Se instalaron en la cámara de corrida los geles de tris-glicinade Anamed (sin SDS, 1 mm de espesor, 10 bolsas de muestras). Como tampon de corrida despés de la dilución se empleó Invitrogen "tris-glicina nativa" (Invitrogen) (10x). Se cargaron las bolsas de muestra y se inició el gel a 200 V y ca 50 mA. La duración de la electroforesis fué de aproximadamente 1,5 horas. La cámara de corrida estaba en agua helada. Después de que se retiró el gel,se colocó en una cápsula de vidrio y se lavó en MES 50mM, MgCl₂ 8mM, pH 6,2 y se incubó.

Después se añadió a éste gel en ésta solución NADP 0,35mM y NAD 0,35mM, 19,6mg de NB-tetrazolio y 2,1 mg de etosulfato de fenazina (PES). Después ocurrió la adición del sustrato (3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol) hasta una concentración final de 1 mM. Se mantuvieron los geles hasta el coloreado en la oscuridad. En la figura 1 se muestra un gel típico.

Balance del aislamiento de la Deshidrogenasa LU 10288

Descripción	Volumen [ml]	Proteína [mg/ml]	Actividad [U/l]	Actividad específica	Valor ee (S)	Proteína total	Actividad total	Rendimiento proteína	Rendimiento en actividad
				[mU/mg]	[%]	[mg]	[U]	[%]	en [%]
Suspensión de células	500		270,1		95,0	0,0	135,1	-	100,0
Homogenizado	610	3,35	98,1	29,3	94,1	2043,5	59,6	100,0	44,3
WP-Q Sefarosa	240	2,25	49,3	21,9	97,0	540,0	11,8	26,4	8,8
WP-Superdex det. directa*	70	2,17	134	61,8	45,3	151,9	9,38	7,4	6,95
WP-Superdex 8 días 4°C**	70	2,17	6,4	2,9	62,4	151,9	0,45	7,4	0,33
WP- Mono Q	21	0,31	9,6	31,0	67,1	6,5	0,20	0,32	0,15
WP-Mono P	4,2	0,91	29,8	32,7	71,3	3,8	0,13	0,19	0,09

Wp: fracciones de pico
 * determinación de actividad de la muestra fresca
 ** determinación de actividad después del tiempo de almacenamiento

El extremoNterminal de la deshidrogenasa así purificada fue determinado según SDS-PAGE y aplicación de blotal gel por medio de la secuenciación de Edman(SEQ ID NO: 1).

Ejemplo 6: Purificación de la deshidrogenasa de *Candida magnoliae*

5 Para la fermentación de *Candida magnoliae* Lu8742 se cultivaron 2 cultivos previos en 150 ml de medio con 8 g/l de extracto de levadura (65%), 5 g/l de peptona, 3,5 g/l de glucosa, 5 g/l KH_2PO_4 , 2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH6,0 por 15 horas a 28 °C y 200 rpm y se inocularon en 13,2 l de medio análogo con 10,7 g/l de glucosa y 4 ml de Tegosipon. La fermentación fue iniciada a28°C, 0,1 bar de presión interior, pH 6,0 con una tasa de aplicación de gas de 5 l/min y 500 rpm (control de $\text{pO}_2 > 20\%$) y fue terminada después de 26 h a un OD600 de 15,1.

10 Homogenización:

Las células recogidas (378 g de biomasa húmeda) fueron suspendidas en 1 l de MES 50 mM + MgCl_2 1 mM, pH 6,5 con 10 tabletas de inhibidor de proteasa Complete(sin EDTA), de la compañía Roche(aproximadamente 9 x conc.) y solubilizadas 2 x con 1000 bar en un microfluidizador Z04. Después de la centrifugación (20 min/10000 g) se purificó la mitad del sobrenadante claro (1,3 l de homogenizado) como se describe a continuación. En ello se probó la actividad de las muestras fraccionadas en diluciones adecuadas en MES 50 mM, pH 6,0, NaDH/NaDPH 0,2 mM, 100 mM de glucosa, 50 $\mu\text{l/ml}$ GDH y 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona10 mM a 30°C.

15

Cromatografía de intercambio iónico en Q-Sefarosa:

Se equilibró una Q-Sefarosa de flujo rápido (Pharmacia) con un diámetro de 5 cm y un volumen de 400 ml en un tampón MES 20 mM, MgCl_2 1 mM, pH 6,8. A 650 ml de homogenizado se añadieron 11 tabletas de Complete (mezcla de inhibidor de proteasa) y se aplicó sobre la columna Q-Sefarosa a una velocidad de aplicación de 7,5 ml/min. La detección ocurrió a 280 nm. Después fue lavado con 700 ml del mismo tampón. Para la elución se ejerció un gradiente lineal de MES 20 mM, MgCl_2 1 mM, NaCl 0,75 M, pH 6,8 (en 100 minutos de 0% NaCl a 100% NaCl) y se lavó 200 ml MES 20 mM, MgCl_2 1 mM, NaCl 0,75M, pH 6,8. Se colectaron y probaron fracciones de 10 ml. La fracción 56 a 96 fue activa en la prueba HPLC a la 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona.

20

25

Precipitación con sulfato de amonio:

Se saturaron al 90% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 6,2), fracciones de pico de 41 ml de Q-Sefarosa, se agitaron por 30 min a 4°C y a continuación se centrifugaron por 10 min a 10000 g. Las pellas obtenidas fueron suspendidas en 10 ml de MES 20 mM, MgCl_2 1 mM, 1 tableta/l de Complete(sin EDTA), compañía Roche, pH 6,2 y se dializaron por 30 min contra MES 20 mM, MgCl_2 1 mM, 1 tableta/l Complete(sin EDTA), compañía Roche, pH 6,2, en un Slide-A-Lyzer de la compañía Pierce (volumen de exclusión de 10 kDa).

30

Cromatografía de tamiz molecular en Superdex:

Se equilibró una columna de tamiz molecular Superdex 200 (Pharmacia) con un diámetro de 2,6 cm y un volumen de 240 ml en MES 20 mM, MgCl_2 1 mM, 1 tableta de Complete por litro de tampón (libre de EDTA frei), pH 6,2. Se aplicó a la columna de tamiz molecular el dializado de la precipitación con sulfato de amonio (2 x 7ml) a un flujo de 4 ml por minuto. Se colectaron fracciones de 4 ml y se probaron. Las fracciones 21 a 24 fueron nuevamente activas para ambos sustratos.

35

Cromatografía de intercambio iónico:

Se equilibró una columna Mono-Q HR5/5 (compañía Pharmacia) con un volumen de 1 ml en MES 20 mM, MgCl_2 1 mM, pH 6,8. Se aplicaron 10ml de las fracciones pico reunidas de la columna Superdex, con una velocidad de flujo de 1ml por minuto. Después del lavado de la columna se desarrolló ésta con un gradiente lineal en 100 minutos a 100% de MES 20 mM, MgCl_2 1 mM, NaCl 0,75 M, pH 6,8 y se enjuagó adicionalmente por 10 min con MES 20 mM, MgCl_2 1 mM, pH 6,8. Se colectaron fracciones de 1 ml (detección a 226 nm). Se juntaron las fracciones activas (fracción 24 a 27).

40

45 En la siguiente tabla se resume el resultado del aislamiento

Muestra	Vol. [ml]	Actividad [U/l]	Actividad total	Rendimiento de actividad	Proteína [g/L]	Proteína total	Rendimiento de proteína	ee(*)	Act. Espec.
---------	-----------	-----------------	-----------------	--------------------------	----------------	----------------	-------------------------	-------	-------------

			[mU]	[%]		[mg]	[%]		[U/g proteína]
Homogenizado	650	30	19500	100,0%	5,70	3705	100	72,1	5,3
Q-Wp	54	42,8	2310	11,8%	3,58	193	5,2	84,6	11,9
Precipitado SA	18	217,2	4005	20,5%	5,49	101	2,7	91,3	39,6
Superdex-Wp	49	35,6	1733	8,9%	0,33	16,1	0,43	91,6	107,7
MonoQ-Wp	12	12,5	148	0,8%	0,05	0,44	0,01	97,0	253,0
* (S)-3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol									
Precipitado SA: precipitado con sulfato de amonio									
Wp: fracciones de pico									

La terminación N de la deshidrogenasa así purificada fue determinada según SDS-PAGE y aplicación de blot gel por medio de la secuenciación Edman (SEQ ID NO: 2).

5 Ejemplo 7: Producción de (S)-3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol I-S mediante reducción con una deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis*

Se cultivó *Lactobacillus brevis* Lu10288 común en el ejemplo 4 y se cosechó. A las células en reposo (10-100 g/L biomasa) se añadió NAD(P)⁺ 0,2 - 2 mM, 1 a 100 g/L de la propanona del ejemplo 1 (lote ofed-batch) y 18 g/L de glucosa y se incubó 2-8 h a 30 °C. Mediante titulación con 0,5 M NaOH se mantuvo la reacción a pH 6,0-7,0 y se le hizo seguimiento mediante análisis HPLC. Las figuras 2A y B muestran cursos típicos según las formulaciones 1 o 2.

- 10 Formulación 1:
- 9 ml suspensión de células Lu10288 (con 200g de BFM/l)
 - 3 ml solución de glucosa 1 M
 - 3 ml solución de NADP 20 mM
 - 0,9 ml solución de GDH (12-15 µ/PI)
 - 15 3 ml solución de NaCl 1 M
 - 11,1 ml agua
 - + 10 mM cetona (del ejemplo 1)
- después de 1 h se añadió nuevamente 10 mM de cetona.

- 20 Formulación 2:
- 9 ml suspensión de células Lu10288 (200g de BFM/l)
 - 3 ml solución de glucosa 1 M
 - 3 ml solución de NADP 2 mM
 - 3 ml solución de NAD 2 mM
 - 25 0,9 ml solución de GDH (12-15 µ/PI)
 - 3 ml solución de NaCl 1 M
 - 11,1 ml agua
 - + 10 mM cetona (0,6 ml de cetona 0,5 M del ejemplo 1 en metanol)

después de 45, 110, 180 y 300 min se añadió nuevamente en cada caso 10 mM de cetona.

A continuación se eliminó la biomasa mediante centrifugación y/o filtración. En el análisis de RMN del extracto MTBE entregó un contenido de 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol de 60-70%. El contenido de 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona queno reaccionó así como los subproductos 1-tien-2-il-propen-1-ona estuvo en cada caso por debajo de 10%. El 1-tien-2-ilpropen-1-ol pudo ser detectado sólo en trazas.

- 5 A continuación se añadió 1,1 g de solución acuosa de metilamina al 40% a la formulación acuosa libres de células. Se agitó la mezcla por 6 h a 60 °C bajo la presión propia. Después del enfriamiento a temperatura ambiente se eliminó el solvente, se digirió con tolueno el residuo y se separó por filtración de este. De modo alternativo, pudo realizarse la separación de las células después de la reacción con la amina. Después del secado el filtrado se obtuvieron 202 mg del compuesto del título en forma de una sustancia sólida amarillo claro. Se obtuvo el enantiómero S en un exceso de enantiómero de 95 % ee. La determinación del valor ee ocurrió mediante determinación del valor de rotación ($c = 1$, solvente: metanol) y por medio desplazamiento RMN (reactivo de desplazamiento: 2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol (+) (TFAE) ; solvente: CDCl_3 ; 500 MHz)

Ejemplo 8: Clonación de la deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis* Lu10288

a) preparación del ADN cromosómico de LU10288 después de previa protoplastización:

15 (1) soluciones requeridas

Solución 1: Sacarosa 0,41 M
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M
 5ml/l de medio M121:2
 10ml/l de KH_2PO_4 10% pH 6,7
 20 2,5 mg/ml de lisozima (añadir justo antes del empleo)

Preparación de la solución 1 como sigue:

14,03 g de sacarosa, 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5ml de M12 (10x conc) y 1 ml de KH_2PO_4 10% pH 6,7 llevados hasta 100 ml y filtrados.

- 25 Proteínasa: compañía Qiagen, 20mg/ml solución madre
 RNase: compañía Qiagen, 100mg/ml solución madre
 Tampón de TE: Tris*Cl 10mM, pH8, EDTA 1 mM pH 8

(2) propagación y disgregación:

- propague durante la noche en 100ml de medio MRS(compañía Difco) en matraz Erlenmeyer de 250ml con placa desviadora a 37°C y 200 rpm.
- 30 -Centrifugación de las células: 4000 rpm, 10 min, 4°C
- Descartar el sobrenadante y recoger las pellas en 5ml de solución 1(+ lisozima) y resuspender bien.Mantener en la incubadora (37°C) 1 - 4h.
- Centrifugar cuidadosamente los protoplastos: 3000 rpm, 10 min.
- Descartar el sobrenadante, lavar las pellas con 10 ml de solución 1 (sinlisozima): 3000 rpm, 4°C, 8 min.
- 35 - Descartar el sobrenadante, lavar las pellas con 10 ml de Tris-HCl 0,01 M pH 8,0: 3000rpm, 4°C, 8 min.
- Descartar el sobrenadante, resuspender las pellas en 4 ml de tampón TE.
- Adición de 0,5 ml de SDS 10% y 0,5 ml de NaCl 5M, mezclar cuidadosamente.
- Adición de 1 mg de proteinasa K (proteinasa Qiagen: 20 mg/ml, por consiguiente 50 μl) e incubación a 37°C, en la incubadora durante la noche.
- 40 -Completar esta formulación con tampón TE hasta 20 ml.

(3) extracción:

- Adición de fenol 1:1, es decir 20ml de fenol + 20 ml de formulación. Mezclar cuidadosamente y centrifugar a 4°C, 4000 rpm, 5min.

- Descartar la fase superior y transferir a un nuevo recipiente(20ml).
 - Adición de 20ml de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar cuidadosamente y centrifugar a 4°C, 4000rpm, 5min.
 - Descartar la fase superior y transferir a un nuevo recipiente (aproximadamente 18ml).
- 5 -Adición de 18 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, por consiguiente 18ml de cloroformo +333µl de alcohol isoamílico). Mezclar cuidadosamente y centrifugar a 4°C, 4000 rpm, 5min. Repetir esta etapa tantas veces como sea necesario hasta que la fase superior esté clara.
- Precipitar la fase superior (18ml) con 2 volúmenes de etanol (36ml). Adición de acetato de sodio 3M 1/50 (aproximadamente 360µl). Dejar precipitar por lo menos 30min a -20°C. Después centrifugar a 4°C, 12000 rpm, 30min.
- 10 -Descartar el sobrenadante y recibir las pellas en 1-2ml de tampón TE. Adición de 20µg RNasepor ml de tampón TE. Incubación: 1 h, 37°C en el baño de H₂O.

(4) Diálisis:

- Después del tratamiento con RNase se coloca la formulación en una manguera de diálisis. Se hace diálisis tres veces en cada caso por 1 hora a 4°C en 1,5 litros de tampón TE. Es posible también hacer la última etapa de la diálisis durante la noche.

- 15 -Colocar el ADN dializado en el recipientey distribuir en varios recipientes Eppendorff(500µl).
- Adición de 2 volúmenes de etanol (1000µl) y 1/3 volumen de LiCl 2M (166µl).
- Precipitación a -20°C, por lo menos 30min. Después centrifugar a 4°C, 12000 rpm, 30min.
- Derramar cuidadosamente el sobrenadante.
- 20 -Lavado de las pellas con 20ml de etanol al 70% y centrifugar a 12000 rpm, 4°C, 15min.
- Derramar cuidadosamente el sobrenadante, dejar secar al aire en las pellas y recibir el ADN en un volumen correspondiente de Tris*HCl 10mM pH 8,0 (dependiendo del tamaño de las pellas a 100 µl).

Para el mejoramiento de la disolución del residuo se incubó el ADN por 1-2 horas en el agitador Eppendorf a 55-60°C a baja frecuencia de agitación (400 rpm).

- 25 b) De la purificación de la proteína del ejemplo 5, después de la digestión trípica y la secuenciación de Edmann de los péptidos, se obtuvieron otras secuencias de aminoácidos. En la figura B3 se resumen los resultados del análisis de secuencia.

Probablemente debido a la ruptura, la secuencia FVVDGGYTAQ (ver V8-RP Fr.7) representa la terminación C. De esto y de la secuencia de aminoácidos de la terminación N (SEQ ID NO. 1), considerando el uso de codón, se derivaron las secuencias de ácidos nucleicos de Lactobacillus brevis (cebador Mke338 y 339), los cuales sirvieron como sigue para la clonación del gen de deshidrogenasa mediante amplificación por PCR sobre ADN cromosómico de Lu10288 (ver arriba el protocolo).

PCR:

Modelo	Cebador	Longitud de producto
ADN cromosómico de Lu10288 *	Mke338+Mke339	Aproximadamente 800 bp
*producido según el ejemplo 8a)		

- 35 Cebador:

Cebador Nr.	Secuencia (5'-3')	Posición
Mke338	GGGAATTCATATGTCTAACCGTTTGG	N-Term-cebador (NdeI)
Mke339	CGTAGGGAAGCTTATTGAGCAGTGTAGC	C-Term-Primer (HindIII)

El PCR fue ejecutado según el procedimiento estándar Stratagene con polimerasa-Pfu (Stratagene) y el siguiente programa de temperatura: 95°C por 5 minutos; 30 ciclos con 95°C por 45 seg., 52°C por 45 seg., y 72°C por 1 min 20 seg; 72°C por 10 min.; 10°C hasta la aplicación. El producto PCR(0,8 kB) fue aislado mediante electroforesis en gel de agarosa (1,2%E-Gel, Invitrogen) y columna cromatográfica (Mini-Elute, Qiagen) y a continuación digerido con NdeI/HindIII y clonado en el correspondiente vector pDHE19.2 digerido (un derivado pJOE, DE19848129). Los insertos de unión fueron transformados en E.coli XL1 Blue (Stratagene). La secuenciación de los clones correspondientes rindió como inserto en el plásmido pDHE10288adh1 así obtenido la secuencia de ácidos nucleicos representada en SEQ ID NO:3, la cual corresponde a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4. En ella se encuentran nuevamente todos los péptidos identificados en los ejemplos 5 y 8.

10 SEQ ID NO: 4 secuencia de aminoácidos de la deshidrogenasa de Lu10288

```

1 MSNRLDGKVA IVTGGTLGIG LAIATKFVVEE GAKVMITGRH SDVGEKAAKS
51 VGTPDQIQFF QHDSSEDEDGW TKLFDATEKA FGPVSTLVNN AGIAVNKSVE
101 ETTTAEWKRL LAVNLDGVFF GTRLGIQRMK NKGLGASIIN MSSIEGFVGD
151 PSLGAYNASK GAVRIMSKSA ALDCALKDYD VRVNTVHPGY IKTPLVDDL
201 GAEEMSQRT KTPMGHIGEP NDIAYICVYL ASNESKFATG SEFVVDGGYT
251 AQ*
    
```

SEQ ID NO: 3 secuencia de ácidos nucleicos de la deshidrogenasa de Lu10288 (así como cuerda contraria)

```

1 ATGTCTAACC GTTGGATGG AAAAGTAGCA ATCGTTACAG GTGGTACGTT
TACAGATTGG CAAACCTACC TTTTCATCGT TAGCAATGTC CACCATGCAA
51 GGGTATCGGT TTAGCTATCG CCACGAAGTT CGTTGAAGAA GGGGCTAAGG
CCCATAGCCA AATCGATAGC GGTGCTTCAA GCAACTTCTT CCCCATTCC
101 TCATGATTAC CGGCCGGCAC AGCGATGTTG GTGAAAAAGC AGCTAAGAGT
AGTACTAATG GCCGGCCGTG TCGCTACAAC CACTTTTTTCG TCGATTCTCA
151 GTCGGCACTC CTGATCAGAT TCAATTTTTC CAACATGATT CTCCGATGA
CAGCCGTGAG GACTAGTCTA AGTTAAAAAG GTTGTACTAA GAAGGCTACT
201 AGACGGCTGG ACGAAATTAT TCGATGCAAC GGAAAAAGCC TTTGGCCAG
TCTGCCGACC TGCTTTAATA AGCTACGTTG CCTTTTTTCGG AAACCCGGTC
251 TTTCTACATT AGTTAATAAC GCTGGGATCG CGGTTAACAA GAGTGTGAA
AAAGATGTAA TCAATTATTG CGACCTAGC GCCAATTGTT CTCACAGCTT
301 GAAACCACGA CTGCTGAATG GCGTAAACTA TTAGCCGTC AACTTGATGG
CTTTGGTCT GACGACTTAC CGCATTTGAT AATCGGCAGT TGGAACTACC
351 TGTCTTCTTC GGTACCCGAT TAGGGATTCA ACGGATGAAG AACAAAGCT
ACAGAAGAAG CCATGGGCTA ATCCCTAAGT TGCCTACTTC TGTTFCCGA
401 TAGGGGCTTC CATCATCAAC ATGTCTTCGA TCGAAGGCTT TGTGGGTGAT
ATCCCCGAAG GTAGTAGTTG TACAGAAGCT AGCTTCCGAA ACACCCACTA
451 CCTAGCTTAG GGGCTTACAA CGCATCTAAA GGGGCCGTAC GGATTATGTC

GGATCGAATC CCCGAATGTT GCGTAGATTT CCCCAGCATG CCTAATACAG
501 CAAGTCAGCT GCCTTAGATT GTGCCCTAAA GGAATACGAT GTTCGGGTAA
GTCAGTCGA CGGAATCTAA CACGGGATTT CCTGATGCTA CAAGCCATT
551 ACACTGTTCA CCCTGGCTAC ATCAAGACAC CATTGGTTGA TGACCTACCA
TGTGACAAGT GGGACCGATG TAGTCTGTG GTAACCACT ACTGGATGGT
601 GGGGCCGAAG AAGCGATGTC ACAACGGACC AAGACGCCAA TGGGCCATAT
CCCCGGCTTC TTCGCTACAG TGTTCCTGG TCTGCGGTT ACCCGGTATA
651 CGGTGAACCT AACGATATTG CCTACATCTG TGTTTACTTG GCTTCTAACG
GCCACTTGGA TTGCTATAAC GGATGTAGAC ACAAATGAAC CGAAGATTGC
701 AATCTAAATT TGCAACGGGT TCTGAATTTG TAGTTGACGG TGGCTACT
TTAGATTAA ACCTTGCCCA AGACTTAAAC ATCAACTGCC ACCGATGTGA
751 GCTCAA
CGAGTT
    
```

Ejemplo 9: Determinación de actividad de la deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus brevis* Lu10288

15 El plásmido pDHE10288adh1 fue retransformado en E.coli TG10 pAgro4 pHSG575 (TG10: un derivado de RhaA de E.coli TG1(Stratagene); pAgro4: Takeshita, S; Sato, M; Toba, M; Masahashi, W; Hashimoto-Gotoh, T (1987) Gene 61, 63-74; pHSG575: T. Tomoyasu et al (2001), Mol. Microbiol. 40(2), 397-413).

20 En cada caso se cultivaron 6 transformantes en 20mL de LBamp/Spec/Cm (100µg/l Amp; 50mg/lSpec; 10µg/lCm) IPTG 0,1 mM 0,5g/L ramnosa en matraces Erlenmeyer de 100 mL (pantallas de desviación) por 18 h a 37°C, se centrifugaron a 5000g/10min, se lavaron una vez un Tris/HCl 10mM pH7,0 y se resuspendieron en 2 ml del mismo tampón. Se

5 incubaron con agitación 100 µl de suspensión de células por 20 min en 900 µl de MES 50mM pH6 con 50µl/ml de glucosa-DH (ejemplo 1), 10mM de glucosa, NaCl 10mM, NADH 1 mM, NADPH 1 mM y con 10 mM 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona. Las formulaciones se analizaron de modo análogo al ejemplo 4. En promedio se formaron 0,13 mM de 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol, lo cual corresponde a una actividad de 6,6 U/L de suspensión cultivo. En las formulaciones análogas con extracto crudo, el cual fue obtenido mediante exposición celular con 0,7ml de esferas de vidrio (d=0,5mm) molino oscilante (3x 5min con enfriamiento intermedio en hielo), fueron medidos 0,21 mM de 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol, correspondientes a una actividad de 10,7 U/L. En pruebas de control sin adición de ramnosa en la propagación, no fue detectable 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol.

Ejemplo 10: Clonación de la deshidrogenasa de *Candida magnoliae* Lu8472

10 De la purificación de proteína del ejemplo 6 se obtuvo después de repetida determinación de la secuencia N terminal, mediante secuenciación de Edmann, la siguiente secuencia de aminoácidos:

(S,G o T)(T o P)TSNALVTGGSRGIGAA

Después de digestión trípica y secuenciación de Edmann del péptido se obtuvo la siguiente secuencia de aminoácidos:

IGVNSINPG

15 Considerando el uso de codón, de los péptidos se derivaron secuencias de ácidos nucleicos de *Candida magnoliae* (cebador Mke366, 367 y 374), las cuales sirven como sigue para la clonación del gen de la deshidrogenasa mediante amplificación PCR sobre ADN cromosómico de Lu8472 (kit ADN genómico con solución de Lyticase de triple concentración, Qiagen, Hilden).

PCR:

Modelo	Cebador	Longitud de producto
ADN cromosómico de Lu8472	Mke366/367+ Mke374	Aproximadamente 480 bp

20

Cebador:

Cebador Nr.	Secuencia (5'-3')	Posición
Mke366	ACGACGACGAGCAACGCBCTBGTBACGG	Cebador N-Term
Mke367	ACGACGACGTCGAACGCBCTBGTBACGG	Cebador N-Term
Mke374	GCCGGGGTTGATSSWGTTACGCCGAT	Cebador C-Term

25 Se mezclaron 1:1 los cebadores MKe366 y MKe367. Se le ejecutó el PCR según el procedimiento estándar Stratagene con Turbo-polimerasaPfu (Stratagene) y el siguiente programa de gradiente de temperatura: 95°C por 1 minuto; 30 ciclos con 95°C por 1 min., X°C¹ por 45 seg, y 72°C por 2 min; 72°C por 10 min.; 10°C hasta la aplicación. Se aisló el producto PCR(- 0,5 kB) mediante electroforesis en gel de agarosa (1,2%E-Gel, Invitrogen) y columna cromatográfica (GFX-Kit, Amersham Pharmacia) y a continuación se hizo secuenciación (cebador de secuencia: Mke 366 y Mke374). La secuencia obtenida es representada en SEQ ID NO:5. La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:6) derivada de allí muestra una identidad de 53% para la carbonil-reductasade *Candida magnoliae* (WO200140450). Las secuencias de péptidos determinadas después de la purificación de la proteína están presentes en desviaciones insignificantes. Las diferencias podrían basarse por un lado en errores de secuencia o estar condicionadas por la existencia de varias isoenzimas en *Candida magnoliae* Lu8742.

30 ¹ Se condujeron 12 intentos con diferentes temperaturas de recocido, de 25°C a 45°C (delta en cada caso de aproximadamente 2 °C). En todos los intentos surgió como producto principal en concentración parecida una banda de 0,5 kB.

35 SEQ ID NO:6 secuencia parcial de aminoácidos de la deshidrogenasa de Lu8472

```

1  NALVTGGSRG IGEATAIKLA EEGYSVTIAS RGLKQLEAVK AKLPIVKQGQ
51  VHHVWQLDLS DVDAAAFVK SPLPASRYDV LVSNAGVAQF SPFIEHAKQD
101 WSQMLAINLA APIALAQTFA KAIGDKPRNT PAHIVFVSSN VSLRGFNPNG
151 VNSITPG
    
```

SEQ ID NO:5 Secuencia parcial de ácidos nucleicos de la deshidrogenasa de Lu8472 (así como cuerda contraria)

```

1 AACGCGCTGG TGACGGGGCGG CAGCCGCGGC ATTGGCGAAG CCACTGCCAT
  TTGCGCGACC ACTGCCC GCCG GTCCGGCCG TAACCGCTTC GGTGACGGTA
51 TAAGCTCGCC GAGGAGGGCT ACAGCGTCAC GATTGCGTCT CGCGGCCTTA
  ATTTCGAGCGG CTCCTCCCGA TGTCGCAGTG CTAACGCAGA GCGCCGGAAT
101 AGCAGCTCGA GGCTGTGAAG GCCAACTAC CCATTGTGAA GCAGGGACAG
  TCGTCGAGCT CCGACACTTC CGGTTTGATG GGTAACTACT CGTCCCTGTC
151 GTTCACCACG TGTGGCAGCT TGATCTCAGT GATGTCGACG CTGCGGCCGC
  CAAGTGGTGC ACACCGTCGA ACTAGAGTCA CTACAGCTGC GACGCCGGCG
201 CTTCAAAGGG TCGCCGCTAC CTGCCAGCCG CTACGACGTG CTCGTCAGCA
  GAAGTTTCCC AGCGGCGATG GACGGTCGGC GATGCTGCAC GAGCAGTCGT
251 ATGCTGGCGT GGCCAGTTT AGCCCGTTCA TCGAGCATGC GAAGCAGGAC
  TACGACCGCA CCGGGTCAA TCGGGCAAGT AGCTCGTACG CTCGTCCTG
301 TGGTCGCAGA TGCTTGCCAT CAATCTGGCG GCACCCATTG CGCTGGCCCA
  ACCAGCGTCT ACGAACGGTA GTTAGACCGC CGTGGGTAAC GCGACCGGGT
351 GACATTTGCT AAGGCCATTG GCGACAAGCC GCGCAACACA CCGGCCACA
  CTGTAAACGA TTCCGGTAAC CGCTGTTCGG CGCGTTGTGT GGCCGGGTGT
401 TTGTGTTTGT CTCGTGGAAC GTCTCGTTGC GAGGCTTCCC GAACATCGGC
  AACACAAACA GAGCAGCTTG CAGAGCAACG CTCGGAAGGG CTGTAGCCG
451 GTCAACTCCA TCACCCCGG CA
  CAGTTGAGGT AGTGGGGGCC GT
  
```

Protocolo de secuencia

[0191]

<110> BASF S.A.

5 <120> Método para la producción de 3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol

<130> M/44142

<160> 6

<170> versión de patente 3.1

<210> 1

10 <211> 47

<212> PRT

<213> Lactobacillus brevis

<400> 1

```

Met Ser Asn Arg Leu Asp Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1           5           10           15

Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Thr Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20           25           30

Lys Val Met Ile Thr Gly Arg His Ser Asp Val Gly Glu Lys Ala
 35           40           45
  
```

15 <210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Candida magnoliae

<400> 2

```

Ser Asn Ala Leu Val Thr Gly Gly Ser Arg Val Ile Gly Ala Gly Gly
 1           5           10           15

Phe Ile
  
```


- <210> 3
- <211> 756
- <212>ADN
- <213> Lactobacillus brevis
- 5 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(756)
- <223>
- <400> 3

```

atg tct aac cgt ttg gat gga aaa gta gca atc gtt aca ggt ggt acg      48
Met Ser Asn Arg Leu Asp Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10           15

ttg ggt atc ggt tta gct atc gcc acg aag ttc gtt gaa gaa ggg gct      96
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Thr Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
20           25           30

aag gtc atg att acc ggc cgg cac agc gat gtt ggt gaa aaa gca gct     144
Lys Val Met Ile Thr Gly Arg His Ser Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
35           40           45

aag agt gtc ggc act cct gat cag att caa ttt ttc caa cat gat tct     192
Lys Ser Val Gly Thr Pro Asp Gln Ile Gln Phe Phe Gln His Asp Ser
50           55           60

tcc gat gaa gac ggc tgg acg aaa tta ttc gat gca acg gaa aaa gcc     240
Ser Asp Glu Asp Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Ala Thr Glu Lys Ala
65           70           75

ttt ggc cca gtt tct aca tta gtt aat aac gct ggg atc gcg gtt aac     288
Phe Gly Pro Val Ser Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Val Asn
85           90           95

aag agt gtc gaa gaa acc acg act gct gaa tgg cgt aaa cta tta gcc     336
Lys Ser Val Glu Glu Thr Thr Thr Ala Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ala
100          105          110

gtc aac ctt gat ggt gtc ttc ttc ggt acc cga tta ggg att caa cgg     384

Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
115          120          125

atg aag aac aaa ggc tta ggg gct tcc atc atc aac atg tct tcg atc     432
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
130          135          140

gaa ggc ttt gtg ggt gat cct agc tta ggg gct tac aac gca tct aaa     480
Glu Gly Phe Val Gly Asp Pro Ser Leu Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145          150          155          160

ggg gcc gta cgg att atg tcc aag tca gct gcc tta gat tgt gcc cta     528
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
165          170          175

aag gac tac gat gtt cgg gta aac act gtt cac cct ggc tac atc aag     576
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Tyr Ile Lys
180          185          190

aca cca ttg gtt gat gac cta cca ggg gcc gaa gaa gcg atg tca caa     624
Thr Pro Leu Val Asp Asp Leu Pro Gly Ala Glu Glu Ala Met Ser Gln
195          200          205

cgg acc aag acg cca atg ggc cat atc ggt gaa cct aac gat att gcc     672
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
210          215          220

tac atc tgt gtt tac ttg gct tct aac gaa tct aaa ttt gca acg ggt     720
Tyr Ile Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asn Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
225          230          235          240

tct gaa ttt gta gtt gac ggt ggc tac act gct caa                       756
Ser Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
245          250

```

10

- <210> 4
- <211> 252
- <212> PRT
- 15 <213> Lactobacillus brevis

ES 2 357 115 T3

<400> 4

```

Met Ser Asn Arg Leu Asp Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1           5           10           15

Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Thr Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20           25           30

Lys Val Met Ile Thr Gly Arg His Ser Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35           40           45

Lys Ser Val Gly Thr Pro Asp Gln Ile Gln Phe Phe Gln His Asp Ser
 50           55           60

Ser Asp Glu Asp Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Ala Thr Glu Lys Ala
 65           70           75           80

Phe Gly Pro Val Ser Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Val Asn
 85           90           95

Lys Ser Val Glu Glu Thr Thr Thr Ala Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ala
 100          105          110

Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115          120          125

Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130          135          140

Glu Gly Phe Val Gly Asp Pro Ser Leu Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145          150          155          160

Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165          170          175

Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Tyr Ile Lys
 180          185          190

Thr Pro Leu Val Asp Asp Leu Pro Gly Ala Glu Glu Ala Met Ser Gln
 195          200          205

Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210          215          220

Tyr Ile Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asn Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225          230          235          240

Ser Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
 245          250

```

<210> 5

5 <211> 472

<212>ADN

<213> Candida magnoliae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(471)

<223>

<400> 5

```

aac gcg ctg gtg acg ggc ggc agc cgc ggc att ggc gaa gcc act gcc      48
Asn Ala Leu Val Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile Gly Glu Ala Thr Ala
1           5           10           15

att aag ctc gcc gag gag ggc tac agc gtc acg att gcg tct cgc ggc      96
Ile Lys Leu Ala Glu Glu Gly Tyr Ser Val Thr Ile Ala Ser Arg Gly
20           25           30

ctt aag cag ctc gag gct gtg aag gcc aaa cta ccc att gtg aag cag      144
Leu Lys Gln Leu Glu Ala Val Lys Ala Lys Leu Pro Ile Val Lys Gln
35           40           45

gga cag gtt cac cac gtg tgg cag ctt gat ctc agt gat gtc gac gct      192
Gly Gln Val His His Val Trp Gln Leu Asp Leu Ser Asp Val Asp Ala
50           55           60

gcg gcc gcc ttc aaa ggg tcg ccg cta cct gcc agc cgc tac gac gtg      240
Ala Ala Ala Phe Lys Gly Ser Pro Leu Pro Ala Ser Arg Tyr Asp Val
65           70           75           80

ctc gtc agc aat gct ggc gtg gcc cag ttt agc ccg ttc atc gag cat      288
Leu Val Ser Asn Ala Gly Val Ala Gln Phe Ser Pro Phe Ile Glu His
85           90           95

gcg aag cag gac tgg tcg cag atg ctt gcc atc aat ctg gcg gca ccc      336
Ala Lys Gln Asp Trp Ser Gln Met Leu Ala Ile Asn Leu Ala Ala Pro
100          105          110

att gcg ctg gcc cag aca ttt gct aag gcc att ggc gac aag ccg cgc      384
Ile Ala Leu Ala Gln Thr Phe Ala Lys Ala Ile Gly Asp Lys Pro Arg
115          120          125

aac aca ccg gcc cac att gtg ttt gtc tcg tcg aac gtc tcg ttg cga      432
Asn Thr Pro Ala His Ile Val Phe Val Ser Ser Asn Val Ser Leu Arg
130          135          140

ggc ttc ccg aac atc ggc gtc aac tcc atc acc ccc gcc a              472
Gly Phe Pro Asn Ile Gly Val Asn Ser Ile Thr Pro Gly
145          150          155

```

5 <210> 6

<211> 157

<212> PRT

<213> Candida magnoliae

<400> 6

```

Asn Ala Leu Val Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile Gly Glu Ala Thr Ala
1           5           10           15

Ile Lys Leu Ala Glu Glu Gly Tyr Ser Val Thr Ile Ala Ser Arg Gly
20           25           30

Leu Lys Gln Leu Glu Ala Val Lys Ala Lys Leu Pro Ile Val Lys Gln
35           40           45

Gly Gln Val His His Val Trp Gln Leu Asp Leu Ser Asp Val Asp Ala
50           55           60

Ala Ala Ala Phe Lys Gly Ser Pro Leu Pro Ala Ser Arg Tyr Asp Val
65           70           75           80

Leu Val Ser Asn Ala Gly Val Ala Gln Phe Ser Pro Phe Ile Glu His
85           90           95

Ala Lys Gln Asp Trp Ser Gln Met Leu Ala Ile Asn Leu Ala Ala Pro
100          105          110

Ile Ala Leu Ala Gln Thr Phe Ala Lys Ala Ile Gly Asp Lys Pro Arg
115          120          125

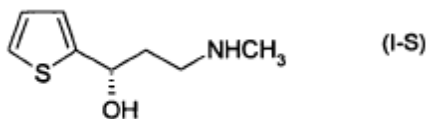
Asn Thr Pro Ala His Ile Val Phe Val Ser Ser Asn Val Ser Leu Arg
130          135          140

Gly Phe Pro Asn Ile Gly Val Asn Ser Ile Thr Pro Gly
145          150          155

```

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de (S)-3-metilamino-1-(tien-2-il)-propan-1-ol de la fórmula I-S



en el cual

- 5 a) reacciona tiofeno con un halogenuro de β -halopropionilo o un halogenuro de acrililo en presencia de un ácido Lewis para dar una 3-halo-1-(tien-2-il)-propan-1-ona, donde se introduce un haluro de hidrógeno simultáneamente o después de terminada la reacción, aunque antes del aislamiento del producto de reacción, y
- 10 b) se reduce la propanona obtenida en la etapa a) en presencia de una deshidrogenasa (E.C. 1.1.x.x.), la cual exhibe una selectividad respecto a la formación de (S)-3-metilamino-1-(tien-2-il)propan-1-ol, y a continuación, dado el caso, se hace reaccionar con metilamina sin aislamiento del producto de reacción.
2. Método según la reivindicación 1, donde en la etapa a) se emplea como ácido Lewis tricloruro de aluminio.
3. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde la reacción de la etapa a) es realizada en un hidrocarburo halogenado como solvente.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, donde se lleva a cabo la reducción en presencia de una deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.x) en particular en presencia de una alcohol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.1 o E.C.1.1.1.2).
5. Método según la reivindicación 1 o 4, donde la deshidrogenasa es elegida de entre deshidrogenasas de levaduras del género *Geotrichum*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* o *Saccharomyces* y de bacterias del género *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Rhodococcus* o *Lactobacillus*.
- 20 6. Método según la reivindicación 5, donde la deshidrogenasa es elegida de entre deshidrogenasas de *Geotrichum candidum*, *Candida magnoliae* y *Lactobacillus brevis*.
7. Método según la reivindicación 1, donde se emplea una alcohol deshidrogenasa con una secuencia de aminoácidos que en la región del extremoN terminal
- 25 a) incluye una secuencia constituyente de aminoácidos de por lo menos 10residuos sucesivos de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, donde preferiblemente adicionalmente a la posición correspondiente según SEQ ID NO:1, la posición 12 de aminoácido representa valina; o
- b) incluye una secuencia constituyente de aminoácidos de por lo menos 10 residuos aminoácidos sucesivos según SEQ ID NO: 2.
8. Método según la reivindicación 7, donde la deshidrogenasa tiene la capacidad de reducir 3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ona hasta (S)-3-cloro-1-(tien-2-il)-propan-1-ol.
- 30 9. Método según la reivindicación 8, donde la deshidrogenasa cataliza la reducción en una pureza de enantiómeros de por lo menos 85 % ee (en presencia de NADH y/o NADPH; a 30°C y pH 6.0).
10. Método según una de las reivindicaciones 7 a 9, donde la deshidrogenasa es codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que incluye SEQ ID NO:3, o abarca una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 4 o por lo menos una secuencia constituyente de acuerdo con la figura 3, y es obtenible preferiblemente de *Lactobacillus brevis* o es una alcohol deshidrogenasa funcionalmente equivalente derivada de ella, con una secuencia de aminoácidos idéntica en por lo menos 60%.
- 35 11. Método según una de las reivindicaciones 7 a 9, donde la deshidrogenasa es codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que incluye SEQ ID NO:5, o exhibe una secuencias de aminoácidos que incluye SEQ ID NO: 6 y es obtenible preferiblemente de *Candida magnoliae* (ATCC 12573) o es una alcohol deshidrogenasa funcionalmenteequivalente derivada de ella, con una secuencia de aminoácidos idéntica en por lo menos 60%.
- 40 12. Método según una de las reivindicaciones 1 a 11, donde se emplea la deshidrogenasa o un microorganismonatural o recombinante que produce esta deshidrogenasa.

Fig. 1

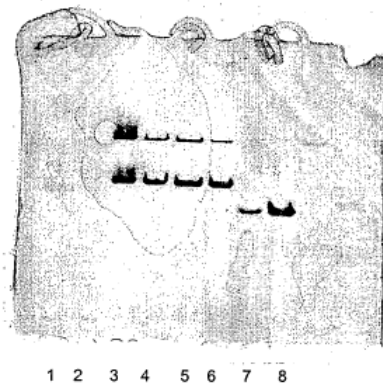


Fig. 2A

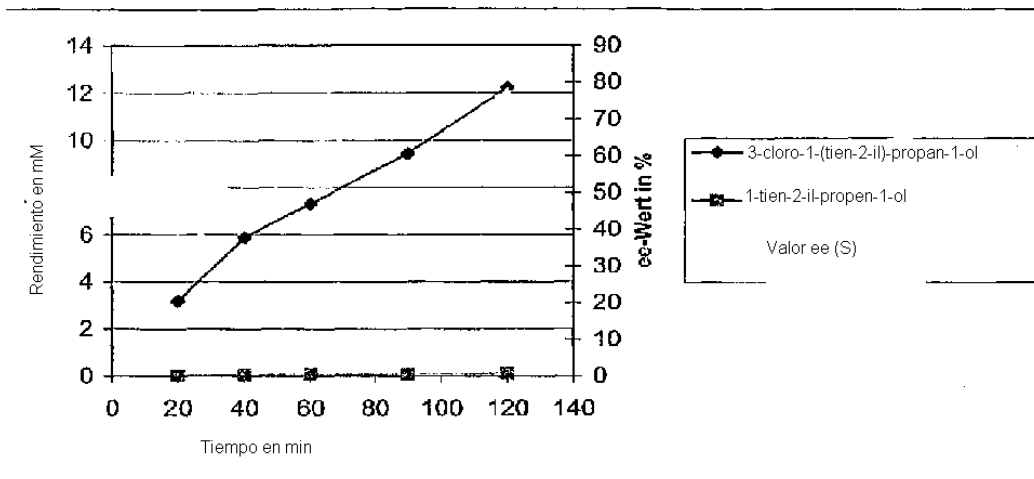


Fig 2B

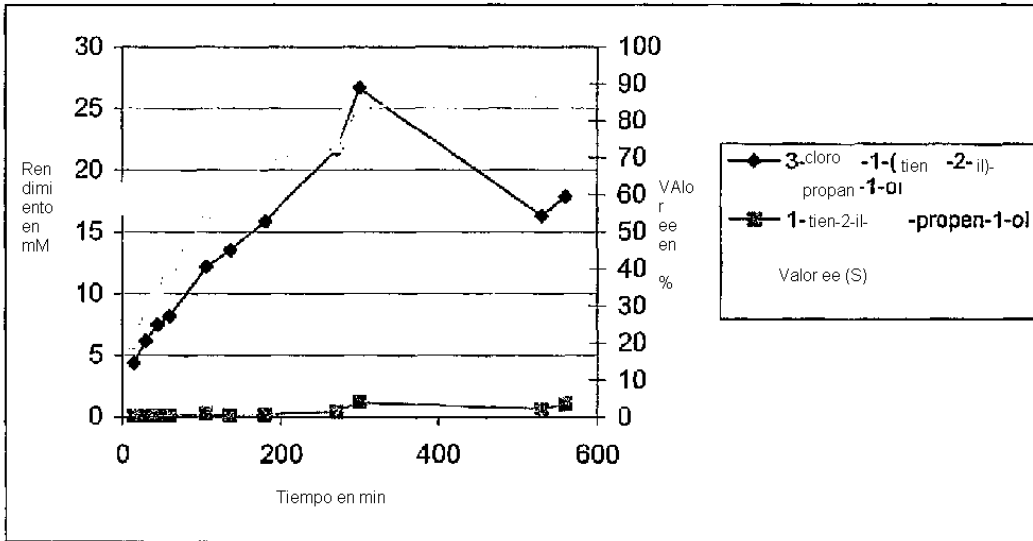


Fig 3A

31278/165 Banda Blot 1 - LU10288 (término N)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
 S N R L D G K V A I V T G G T L G I G L A I A T

 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49
 F V E E G A K V M I T G R H S D V G E K A A (K) S
 K (A)

 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
 G T P D Q I Q F F /
 T V /
 G /
 N /

Fig 3B

1. Digestión líquida con Tripton Fr.34 WP Mono P 31279/170

5

Tr-Sp-RP Fr. 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
T	P	L	V	D	D	L	P	G	A	E	E	A	M	S	Q	R	(R)	/	/
S	V	G	T	P	E	Q	I	Q	F	F	Q	H	D	R					
F	A	T		S	I	F	V	K				Y	T						
					A		P												

Tr-Sp-RP Fr. 6

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S	V	E	E	T	T	T	A	E	(W)	R	/	/	/	/

Tr-Sp-RP Fr. 18

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S	V	G	T	P	D	Q	J	Q	F	F	Q	H	D	S	S	D	E	D	G

Tr-Sp-RP Fr. 4 (3/4 de filtro)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
V	N	I	V	H	E	G	Y	J	K	/	/	/	/	/
L	F	D	A	T	E	K	/	/	/	/	/	/	/	/

Tr-Sp-RP Fr. 4 (1/4 de filtro)

1	2	3	4
V	N	I	V
L	F	D	A

Tr.-RP Fr. 3

1	2	3	4	5	6	7
A	E	I	E	Q	K	R
V	M		Q	Y		N
I						

L,S

2. Digestión líquida V8 Fr.34 WP Mono P 31279/170

V8-RP Fr. 30

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
K	A	A	K	S	V	G	T	P	D	Q	I	Q	F	F	Q	H	D	S	S	P	E	(V)	(V)
T	G	L	F	L		V	L	R	V	A	T	V		P	G	Y	I	K	A	T		A	N
Q				R			V		N	E								D					

V8-RP Fr. 19

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
/	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	R			A					I			D							

V8-RP Fr. 18

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<u>T/G</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>(G)</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	<u>I/N</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>(P)</u>
V		V	N	T	V	H	P	G	Y	I	K	T	P	L	M	D	D	D	
											D				G			L	
															V				

V8-RP Fr. 22

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<u>G</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>I</u>
Q	V	L		A	Q	N	M	K	N	G	G	L	S	A	M	I	K	N	M
T	S			I	Y	R	A		K	K	A	V	R	I	S				A
P							K												
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30										
<u>M</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>(D)</u>	/	/										

V8-RP Fr. 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
F	V	V	D	/	/	/	/	/	/

Tr.-Sp.-RP Fr. 8

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 (S) A A L D / A L K / / / / / /

Tr.-Sp.-RP Fr. 23

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
S A A L D / A L K D Y / V R / / / /
 F (A) T G S E F V V (D) G G Y T A Q / /

Tr.-Sp.-RP Fr. 14

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
S A A L D / A L K / / / / / / / /

Tr.-Sp.-RP Fr. 31

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 < L L A V N L D G V F F G T R / / / / /

Tr.-Sp.-RP Fr. 2

1 2 3 4 5 6
 / M / T G R

Tr.-Sp.-RP Fr. 27

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
I K I P M G H I / E P N / I A
 S A A L D G A L K D Y D V R /
 F A T G S E F V V D G G Y T A

Tr.-Sp.-RP Fr. 28

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
I K I P M G ? I (A) E (P) (N) (D) I A Y / / / / /
 F A T G S E F V V D G G Y T A Q
 S A A L D (C) A L K D Y D V R /

V8-RP Fr. 30

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
K	A	A	K	S	V	G	T	P	D	Q	I	Q	F	F	Q	H	D	S	S	P	E	(V)	(V)
T	G	L	F	L		V	L	R	V	A	T	V		P	G	Y	I	K	A	T		A	N
Q				R			V		N	E								D					

V8-RP Fr. 19

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
/	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	K			A				I											
	R							D											

V8-RP Fr. 18

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<u>T/G</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>(G)</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	<u>I/N</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>(P)</u>
V		V	N	T	V	H	P	G	Y	I	K	T	P	L	M	D	D	D	
											D				G			L	
															V				

V8-RP Fr. 22

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<u>G</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>I</u>
Q	V	L		A	Q	N	M	K	N	G	G	L	S	A	M	I	K	N	M
T	S			I	Y	R	A		K	K	A	V	R	I	S				A
P						K													
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30										
<u>M</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>(D)</u>	/	/										

V8-RP Fr. 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
F	V	V	D	/	/	/	/	/	/

V8-RP Fr. 26

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<u>D</u>	<u>G</u>	/	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>(E)</u>	/	/	/	/	/	/	/	/
R	K	(L)	K	D	A		E	D											
	Y	(F)		P															

V8-RP Fr. 7 (C-Terminus)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
F	V	V	D	G	G	Y	T	A	Q	/	/	/	/

V8-RP Fr. 28

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
/	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>H</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>T</u>
	S																		
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30										
<u>P</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>(V)</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>E</u>										
			D					(G)											

V8-RP Fr. 9

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
K	A	A	K	S	V	G	T	P	D	Q	I	Q	F	F

V8-RP Fr. 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
G	A	K	V	M	I	T	G	R	H	S	D	V

V8-RP Fr. 12

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<u>S</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>V</u>
A		G		F	V	Y	L		
				I					

V8-RP Fr. 21

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
/	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>H</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	I	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>D</u>
	V	F	K	I									G	A				N	M
	S	L	G	A															
	L			G															
21	22	23	24	25															
<u>L</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>E</u>															
	L																		

V8-RP Fr. 41

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
W	/	K	L	L	A	V	N	L	D	G	V	F	F	G	T	R	L	G	I
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Q	R	M	K	N	K	G	L	G	A	S	I	I	N	M	(S)	(S)	(I)	/	/

V8-RP Fr. 43

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(A)	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>M</u>	<u>G</u>	<u>H</u>	I	(G)	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	I	<u>A</u>
		K	L	L	A	V	N	L	D	G	V	F	F	G	T	R	L	G	I
		A	K	S	V	G			A	Q	I	A							
			E							Y	N	Q							
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
<u>Y</u>			<u>Y</u>	<u>A</u>															
Q	R	M	K	N	K	G	L	G	A	S	I	I	N	M	S				G

V8-RP Fr. 11

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S	K	F	A	T	G	S	E	F	V	V	/	/	/	/

V8-RP Fr. 15

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<u>S</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	/	/	/
A			T	I	L	Q	I	Q		L	Q			
F			P	D						S	K			
V														