(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 363 374**

(51) Int. Cl.:
C12P 7/62 (2006.01)
C12P 41/00 (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06819032 .1**
(96) Fecha de presentación : **14.12.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1963516**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

(54) Título: **Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de compuestos hidroxiceto.**

(30) Prioridad: **19.12.2005 AT A 2027/2005**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **02.08.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **02.08.2011**

(73) Titular/es: **IEP GmbH**
Rheingaustrasse 190-196
65203 Wiesbaden, DE

(72) Inventor/es: **Gupta, Antje;**
Bobkova, Maria y
Tschentscher, Anke

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

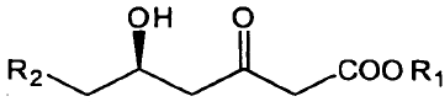
ES 2 363 374 T3

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).

DESCRIPCIÓN

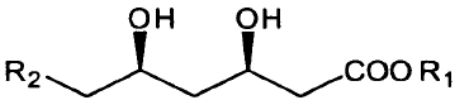
Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de compuestos hidroxiceto

La invención se refiere a un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de una hidroxicetona de fórmula general I



(I)

en la que R_1 = alquilo C_1-C_6 y R_2 = -Cl, -CN, -OH, -H o alquilo C_1-C_6, a un diol quiral de fórmula general II



(II)

en la que R_1 y R_2 tienen el mismo significado que en la fórmula I, en donde la hidroxicetona se reduce con una oxidorreductasa en presencia de un cofactor.

Los dioles quirales de la fórmula general II son compuestos intermedios importantes en la producción de medicamentos, en particular en la producción de inhibidores de HMG-CoA-reductasa. Tales dioles quirales son, por ejemplo, (3R,5S)-6-cloro-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo, (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo o (5S,3R)-3,5,6-trihidroxihenaoato de terc-butilo.

Los dioles de esta clase se producen en particular mediante la reducción enantioselectiva de las correspondientes hidroxicetonas de fórmula I, como por ejemplo, (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo o (5S)-5,6-dihidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo. La reducción química catalizada tiene al mismo tiempo el inconveniente que por una parte, debido a las duras condiciones de reacción puede producir subproductos, y por otra parte produce excesos enantioméricos o diastereoméricos insuficientes y técnicamente solo se puede realizar de forma muy laboriosa.

Por este motivo desde hace tiempo se hacen esfuerzos para desarrollar procedimientos biocatalíticos, que permitan la reducción enantioselectiva de las hidroxicetonas mencionadas. Los procedimientos biocatalíticos normalmente operan en condiciones moderadas, por lo que se espera que hagan posible la reducción de los derivados 5-hidroxi-3-oxohexanoato, que de todos modos son bastante inestables, sin la formación de subproductos adicionales. Sin embargo, hasta ahora no se ha podido encontrar ningún biocatalizador apropiado con el que sea posible la reducción enzimática de los derivados 5-hidroxi-3-oxohexanoato mencionados de forma efectiva y con enzimas aisladas.

La patente de EE UU 6.001.615 y la solicitud internacional de patente WO 01/85975 A1, por ejemplo, describen la reducción de (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo o (5S)-5,6-dihidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, con diferentes levaduras de los géneros *Beauvaria*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces* y *Toruplaspora*. Las conversiones tienen lugar en efecto solo con células enteras de las cepas salvajes y por tanto solo se pudieron llevar a cabo a concentraciones muy bajas, muy por debajo del 5%. Las secuencias de la enzima y ADN responsables de las conversiones no se han podido identificar hasta la fecha.

Además se describen conversiones microbianas de compuestos estructuralmente similares en el documento EP 0 569 998 B1. En el mismo se pudo purificar incluso una enzima dependiente de NADH de *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 33305, que también se usa aislada junto con glucosa deshidrogenasa para la regeneración de coenzimas. En el proceso descrito se usa el sustrato en concentraciones del 1% y se alcanza un “número total de recambio” (“total turn over number”) de NADH de solo 10. No se muestra un procedimiento industrial aplicable.

En la patente de EE UU 6.645.746 B1 se divulga una secuencia de aminoácidos de *Candida magnoliae* que se puede usar para reducir (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo a (3R,5S)-6-cloro-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo con ayuda de NADPH. En la descripción de este documento se usa preferiblemente la enzima coexpresada con glucosa deshidrogenasa de *Bacillus megaterium*, en donde la regeneración del cofactor NADPH se produce con ayuda de la glucosa deshidrogenasa y con glucosa como cosustrato.

El documento WO 2004/111083 A describe un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de cetonas, en particular ésteres de 2- y 3-oxoácidos, estando catalizada la reacción por una oxidorreductasa de *Pichia capsulata*.

En el documento WO 2005/108593 A se describe un procedimiento para la producción de 1-butanol, en el que se reduce 2-butanona con una carbonilreductasa, por ejemplo de *Candida parapsilosis*, y una coenzima en un sistema de dos fases.

Es el objeto de la invención proporcionar un procedimiento que permite la producción económica de dioles enantioméricamente puros de fórmula general II con mayor rendimiento y mayor pureza enantiomérica sin subproductos.

El objeto anteriormente mencionado se soluciona según la invención mediante un proceso del tipo mencionado al principio según el cual la oxidorreductasa

a) muestra una secuencia de aminoácidos en la que al menos el 50% de los aminoácidos son idénticos a los de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14, en donde la secuencia de aminoácidos no es *Candida magnoliae* IFO 0705,

b) está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15, o

c) está codificada por una secuencia de ácido nucleico que hibrida con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15 en condiciones rigurosas.

Se ha encontrado que los polipéptidos con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 11 muestran actividad oxidorreductasa y se pueden usar para reducir (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo con un exceso diastereomérico de >99%. De la misma manera se pueden reducir otras hidroxicetonas de la fórmula general I por medio de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 11.

Además, las oxidorreductasas anteriormente mencionadas tienen la ventaja de que son capaces de regenerar el cofactor oxidado producido en la reducción mediante la reducción de un alcohol secundario. Una ventaja económica particular de la oxidorreductasa mencionada consiste también en que, al contrario que en los procesos de la técnica anterior (documentos US 6.645.746 B y EP 0 569 998 B) no se debe emplear ninguna enzima adicional para la regeneración del cofactor.

Una secuencia de ADN SEQ ID NO: 2, que codifica el polipéptido con la SEQ ID NO: 1, se puede obtener, por ejemplo del genoma del organismo *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941. Además se ha encontrado que la secuencia de ADN SEQ ID NO: 3 se puede usar para expresar el polipéptido de SEQ ID NO: 1 en *Escherichia*.

Una secuencia de ADN SEQ ID NO: 9, que codifica el polipéptido con la SEQ ID NO: 8, se puede obtener, por ejemplo del genoma del organismo *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465. Además se ha encontrado que la secuencia de ADN SEQ ID NO: 10 se puede usar para expresar el polipéptido de SEQ ID NO: 8 en *Escherichia*.

Una secuencia de ADN SEQ ID NO: 12, que codifica el polipéptido con la SEQ ID NO: 11, se puede obtener, por ejemplo del genoma del organismo *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635.

Una secuencia de ADN SEQ ID NO: 15, que codifica el polipéptido con la SEQ ID NO: 14, se puede obtener, por ejemplo del genoma del organismo *Candida magnoliae* CBS 6396.

La presente invención se refiere por tanto a un proceso para la reducción de hidroxicetonas de fórmula general I a dioles de fórmula general II mediante el uso de un polipéptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14, o un polipéptido que muestra una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50% idéntica a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14, esto es, un polipéptido que puede derivar mediante sustitución, inserción, deleción o adición de al menos un aminoácido de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14, en donde la secuencia de aminoácidos no es *Candida magnoliae* IFO 0705, o mediante el uso de un polipéptido, codificado por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 15 o que está codificado por una secuencia de ácido nucleico que hibrida con SEQ ID: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 15 en condiciones rigurosas.

Mediante una secuencia de ácido nucleico que por ejemplo hibrida con SEQ ID NO: 2 en condiciones rigurosas, se entiende un polinucleótido que se puede identificar mediante el método de hibridación en colonias, el método de hibridación en placa, método de hibridación Southern o similares, usando SEQ ID NO: 2 como sonda de ADN.

Para este fin se hibrida el polinucleótido inmovilizado en un filtro por ejemplo con SEQ ID NO: 2 en una solución de NaCl 0,7-1 M a 60ºC. La hibridación se llevará cabo como se describe, por ejemplo, en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) o publicaciones similares. A

continuación, el filtro se lava con solución SSC de 0,1 a 2 veces a 65ºC, en donde se entiende que una solución SSC de 1 vez es una mezcla que consiste en NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM.

En el proceso según la invención, el polipéptido con la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14, o los polipéptidos derivados de estos polipéptidos, respectivamente, se pueden usar completamente purificados, parcialmente purificados o como células que comprenden el polipéptido SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14. Por tanto, las células usadas se pueden suministrar en forma nativa, permeabilizada o lisada. Preferiblemente, el polipéptido con la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14, o derivados obtenibles de los mismos, respectivamente, se sobreexpresan en un organismo huésped adecuado tal como, por ejemplo, *Escherichia coli*, y se usa el polipéptido recombinante para la reducción de la hidroxicetona de fórmula general I.

Por cada kg de compuesto de fórmula I que se va a hacer reaccionar se usan de 5000 a 10 millones U de oxidorreductasa de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14, o sus respectivos derivados (abiertos hacia arriba). La unidad enzimática 1 U corresponde a tal cantidad de enzima que se requiere para hacer reaccionar 1 µmol de la hidroxicetona de fórmula I por minuto (min).

La reducción enzimática según la invención transcurre en condiciones suaves, de modo que la descomposición de la con frecuencia inestable hidroxicetona y por tanto la formación de subproductos no deseados se puede evitar en gran parte. El proceso según la invención muestra un tiempo de vida alto y una pureza diastereomérica de normalmente > 99% de los dioles quirales producidos.

Una forma de realización preferida de la invención se caracteriza en que el cofactor usado en el proceso se reduce continuamente con un cosustrato. Preferiblemente, se usa NAD(P)H como cofactor, en donde el NAD(P) formado por la reducción se vuelve a reducir a NAD(P)H por medio del cosustrato.

Como cosustratos se usan preferiblemente alcoholes secundarios, como 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-heptanol, 2-octanol o ciclohexanol. Según una forma de realización especialmente preferida se usa 2-propanol para la regeneración de la coenzima. La parte de cosustrato para la regeneración puede variar del 5 al 95% en volumen, referido al volumen total.

La regeneración coenzimática se efectúa, por ejemplo, asimismo a través del polipéptido con la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14.

La hidroxicetona de fórmula general I se usa en un proceso según la invención preferiblemente en una cantidad del 5% en peso hasta el 50% en peso (de 50 g/l hasta 50 g/l), referido al volumen total, preferiblemente del 8% en peso hasta el 40% en peso, especialmente del 10% en peso hasta el 25% en peso.

Una forma de realización especialmente preferida se caracteriza en que como la hidroxicetona de fórmula general (I) se usa (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo o (5S)-5,6-dihidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo.

Preferiblemente el proceso según la invención se lleva a cabo en un sistema bifásico acuoso orgánico.

La parte acuosa de la mezcla de reacción, en la que transcurre la reducción enzimática, comprende preferiblemente un tampón, por ejemplo, tampón fosfato de potasio, Tris/HCl o trietanolamina, con un valor de pH de 5 a 10, preferiblemente un pH de 6 a 9. El tampón puede comprender además iones para estabilizar o activar la enzima, como por ejemplo iones de zinc o iones de magnesio.

La temperatura varía durante la realización del proceso según la invención de forma conveniente desde alrededor de 10ºC hasta 70ºC, preferiblemente de 20ºC a 45ºC.

En una forma de realización más preferida del proceso según la invención, la conversión enzimática se lleva a cabo en presencia de un disolvente orgánico no miscible con agua o solo miscible a un grado limitado. Este disolvente es, por ejemplo, un dialquil(C_1-C_6)éter simétrico o asimétrico, un alcano o cicloalcano de cadena lineal o ramificado o un alcohol secundario insoluble en agua, que al mismo tiempo representa el cosustrato. Los disolventes orgánicos preferidos son dietiléter, terc-butilmetil éter, diisopropiléter, dibutiléter, acetato de butilo, heptano, hexano, 2-octanol, 2-heptanol, 4-metil-2-pentanol y ciclohexanol. En el caso de los alcoholes secundarios mencionados en último lugar, el disolvente también puede servir al mismo tiempo como cosustrato para la regeneración del cofactor.

La mezcla de reacción consiste en, si se usan disolventes o cosustratos insolubles en agua, respectivamente, una fase acuosa y una orgánica. La hidroxicetona se reparte según su solubilidad entre la fase orgánica y la acuosa. La fase orgánica tiene en general una proporción del 5 al 95%, preferiblemente del 10 al 90%, referido al volumen total de reacción. Las dos fases líquidas se mezclan preferiblemente de forma mecánica, de modo que se produzca una gran superficie entre ellas. También en esta forma de realización, por ejemplo, el NAD formado por la reducción enzimática, se puede reducir de nuevo a NADH con un cosustrato, como se ha descrito anteriormente.

La concentración del cofactor, en especial NADH o NADPH, respectivamente, en la fase acuosa varía en general de 0,001 mM a 10 mM, en especial de 0,01 mM a 1 mM.

En el proceso según la invención también se puede usar un estabilizador de la oxidorreductasa/deshidrogenasa. Estabilizadores adecuados son por ejemplo, glicerol, sorbitol, 1,4-DL-ditiotreitol (DTT) o dimetilsulfóxido (DMSO).

El proceso según la invención se lleva a cabo, por ejemplo, en un recipiente de reacción cerrado de vidrio o metal. Para ello, se transfieren los componentes individuales en el recipiente de reacción y se agitan en una atmósfera de, por ejemplo, nitrógeno o aire.

Según otra forma de realización posible de la invención, el cosustrato oxidado (por ejemplo, acetona) se puede eliminar continuamente y/o añadir de nuevo el cosustrato (por ejemplo, 2-propanol) continuamente, para desplazar el equilibrio de la reacción en dirección hacia el producto de reacción (diol de fórmula general II).

En una forma de realización adicional la adición de oxidorreductasa según SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14 y/o de cosustrato también se puede efectuar por pasos durante el curso del proceso.

Después de terminar la reducción la mezcla de reacción se procesa. Para ello, la fase acuosa se separa, dado el caso, de la fase orgánica y la fase orgánica que contiene el producto se filtra. La fase acuosa también se puede, si se diera el caso, extraer y procesar adicionalmente como la fase orgánica. Después de ello, el disolvente se evapora de la fase orgánica y se obtiene el diol de fórmula general II como producto crudo. El producto crudo se puede purificar entonces adicionalmente o usar directamente para la síntesis de un producto sucesivo.

A continuación, la invención se explica adicionalmente por medio de ejemplos.

Ejemplo 1

Clonación de una oxidorreductasa de *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941

A) Cultivo de *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941

Se cultivaron células de *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941 en el siguiente medio a 50ºC (pH 7,2) y 140 rpm en un agitador de bacterias: extracto de levadura al 0,1%, triptona al 0,1%, $CaSO_4$ x $2H_2O$ al 0,004%, $MgCl_2$ x $6H_2O$ al 0,02%, ácido nitrilotriacético al 0,01%, 100 ml de tampón fosfato [KH_2PO_4 5,44 g/l, Na_2HPO_4 x $12H_2O$ 43 g/l], 500 µl/l de citrato de Fe 0,01 M, 500 µl/l de oligoelementos [H_2SO_4 500 µl/l, $MnSO_4$ x H_2O 2,28 g/l, $ZnSO_4$ x $7H_2O$ 500 mg/l, H_3BO_3 500 mg, $CuSO_4$ x $5H_2O$ 25 mg/l, Na_2MoO_4 x $2H_2O$ 25 mg/l, $CoCl_2$ x $6H_2O$ 45 mg/l]. El día 6 del cultivo se separaron las células del medio de cultivo mediante centrifugación y se almacenaron a -80ºC.

B) Amplificación del gen que codifica la oxidorreductasa selectiva

Se extrajo el ADN genómico según el método descrito en “Molecular Cloning” de Manniatis & Sambrook. El ácido nucleico resultante sirvió de molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos, que se derivaron de la secuencia génica publicada en la base de datos de NCBI con el número 46106817. Para ello se proporcionó a los cebadores en posición 5’ terminal sitios de corte de restricción para las endonucleasas Nde I y Hind III o Sph I, respectivamente (SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO. 7), para una clonación posterior en un vector de expresión.

La amplificación se llevó a cabo en un tampón de PCR [Tris-HCl 10 mM, (pH 8,0); KCl 50 mM; $MgSO_4$ 10 mM; mezcla de dNTP 1 mM; por 20 pMol de cebador y 2,5 U de Pfx ADN polimerasa Platinum (Invitrogen)] con 500 ng de ADN genómico y los siguientes ciclos de temperatura:

Ciclo 1:	94ºC, 2 minutos
Ciclo 2 x 30:	94ºC, 15 segundos
	54ºC, 30 segundos
	68ºC, 60 segundos
Ciclo 3:	68ºC, 7 minutos
	4ºC, ∞

El producto de PCR resultante con un tamaño de alrededor de 750 pb después de purificación en un gel de agarosa al 1% se sometió a restricción con ayuda de las endonucleasas *Nde I* y *Hind III* o *Sph I* y *Hind III*, respectivamente y se ligó en el esqueleto del vector pET21a (Novagen) o del vector pQE70 (Qiagen) tratados con las mismas endonucleasas. Después de la transformación de 2 µl de la reacción de ligación en células *E. coli* Top 10F’ (Invitrogen) se probó la presencia de un inserto de un tamaño de 750 pb en el ADN plasmídico de colonias resistentes a ampicilina por medio de un análisis de restricción con las endonucleasas *Nde I* y *Hind III* o *Sph I* y *Hind III*, respectivamente. Las preparaciones de plásmido de los clones positivos para el fragmento se sometieron a un

análisis de secuencia y por último se transformaron en *Escherichia coli* BL21 Star (Invitrogen) o *E. coli* RB791 (reserva genética, Yale), respectivamente.

Ejemplo 2

Expresión eficiente de polipéptido SEQ ID NO: 1 en células de *Escherichia coli*

Para la expresión eficiente del polipéptido SEQ ID NO: 1 en células de *Escherichia coli* se usó el ADN codificante de SEQ ID NO: 3 para la clonación en un vector de expresión como molde en una reacción de PCR. Esta secuencia de ADN se diferencia en la región de los primeros 160 pares de bases de la secuencia de ADN anteriormente conocida (SEQ ID NO: 2) en 51 bases. Esta modificación era conservadora y no produjo ningún cambio de la secuencia de aminoácidos.

La amplificación se llevó a cabo en un tampón de PCR [Tris-HCl 10 mM, (pH 8,0); KCl 50 mM; $MgSO_4$ 10 mM; mezcla de dNTP 1 mM; por 20 pMol de cebador (SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 5) y 2,5 U de Pfx ADN polimerasa Platinum (Invitrogen)] con 50 ng de ADN de SEQ ID NO: 3 como molde y los siguientes ciclos de temperatura:

Ciclo 1:	94ºC, 2 minutos
Ciclo 2 x 30:	94ºC, 40 segundos
	56ºC, 30 segundos
	68ºC, 60 segundos
Ciclo 3:	68ºC, 7 minutos
	4ºC, ∞

El producto de PCR resultante con un tamaño de alrededor de 750 pb después de purificación en un gel de agarosa al 1% con ayuda de las endonucleasas *Nhe I* y *Hind III* se ligó en el esqueleto del vector pET21a (Novagen) tratado con las mismas endonucleasas. Después de la transformación de 2 µl de la reacción de ligación en células *E. coli* Top 10F' (Invitrogen) se probó la presencia de un inserto de un tamaño de 750 pb en el ADN plasmídico de colonias resistentes a ampicilina por medio de un análisis de restricción con las endonucleasas *Nhe I* y *Hind III*. Las preparaciones de plásmido de los clones positivos para el fragmento se sometieron a un análisis de secuencia y por último se transformaron en *Escherichia coli* BL21 Star (Invitrogen).

Ejemplo 3

Producción de la oxidorreductasa de *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941

Se cultivaron *Escherichia coli* de las cepas BL21 Star (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y RB791 (reserva genética de *E. coli*, Yale, EE UU), respectivamente, transformadas con la construcción de expresión en medio (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%) con ampicilina (50 µg/ml), hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0,5 medida a 550 nm. La expresión de proteína recombinante se indujo mediante la adición de isopropiltiogalactósido (IPTG) a una concentración de 0,1 mM. 16 horas después de la inducción a 25ºC y 220 rpm se recogieron las células y se congelaron a -20ºC.

Para la obtención de la enzima se suspendieron 30 g de células en 150 ml de tampón de trietanolamina (100 mM, pH=7, $MgCl_2$ 2 mM, glicerol al 10%) y se rompieron por medio de un homogenizador de alta presión. A continuación, la solución de enzima se mezcló con 150 ml de glicerol y se almacenó a -20ºC.

La solución enzimática obtenida de esta manera se usó para la síntesis de (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo.

La solución enzimática obtenida se diluyó también para usarla en las correspondientes medidas enzimáticas. Para ello, la prueba de actividad se realizó como sigue: 870 µl de tampón TEA 100 mM, pH 7,0, 160 µg de NAD(P)H, 10 µl de lisado celular diluido. La reacción se inició mediante la adición de 100 µl de la disolución de sustrato (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo 100 mM a la mezcla de reacción.

Ejemplo 4

Conversión de (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo por medio de la oxidorreductasa de SEQ ID NO: 1

Para la conversión de (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo se incubó en un tubo Eppendorf una mezcla de 900 µl de tampón (TEA 100 mM, pH = 7, $MgCl_2$ 1 mM), 100 µl de 2-propanol, 10 µl de producto crudo (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo (pureza enantiomérica >99%), 0,1 mg de NAD y 100 µl de suspensión enzimática (véase el ejemplo 3) durante 24 horas a temperatura ambiente con agitación continua. Después de 24 horas el 96% del (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-

oxohexanoato de terc-butilo usado se había reducido a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo. El exceso diastereomérico ascendía a >99%.

La determinación de la conversión así como del exceso diastereomérico se produjo mediante cromatografía de gases quiral. Para ello se usaron un cromatógrafo de gases GC-17A de Shimadzu con una columna de separación quiral CP-Chirasil-DEX CB (Varian Chrompack, Darmstadt, Alemania), un detector de ionización de llama y helio como gas portador.

La separación de 6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo se produjo a 0,72 bares y 10 minutos a 50ºC, 5ºC/min → 200ºC durante 10 minutos.

Los tiempos de retención fueron: (R-BCH) 4,4 minutos; (R,R-BCH) 47,1 minutos y (R,S-BCH) 48,2 minutos.

Ejemplo 5

Síntesis de (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo a partir de (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo por medio de la oxidorreductasa de SEQ ID NO: 1

Para una conversión adicional del (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo se incubó en un tubo Eppendorf una mezcla de 550 µl de tampón (TEA 100 mM, pH = 7, $MgCl_2$ 1 mM), 150 µl de 2-propanol, 200 µl de producto crudo (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo (pureza enantiomérica >99%), 0,1 mg de NAD y 200 µl de suspensión enzimática (véase el ejemplo 3). En el curso de la reacción la mezcla acetona/2-propanol formada se evaporó varias veces mediante la introducción de nitrógeno y se añadieron 2-propanol y 50 µl de enzima nuevos. Después de repetir de 2 a 3 veces en un intervalo de 24 horas, >90% del (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo usado se había reducido a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo. El exceso diastereomérico ascendía a >99%.

Ejemplo 6

Síntesis de (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo a partir de (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo por medio de la oxidorreductasa de SEQ ID NO: 1

Para una conversión adicional del (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo se incubó en un recipiente de reacción una mezcla de 6,7 ml de tampón (TEA 100 mM, pH = 9), 1,7 ml de 2-propanol, 2 ml de producto crudo (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo (pureza enantiomérica >99%), 1,0 mg de NAD y 150 mg de células congeladas de *E. coli* BL21 Star, que contenían la oxidorreductasa de SEQ ID NO: 1 (véase el ejemplo 3) a 45ºC. Después de 24 horas, >90% del (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo usado se había reducido a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo. El exceso diastereomérico ascendía a >99%.

Ejemplo 7

Síntesis de (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo a partir de (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo por medio de la oxidorreductasa de SEQ ID NO: 8

Para una conversión adicional del (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo se incubó en un recipiente de reacción una mezcla de 5,0 ml de tampón (TEA 100 mM, pH = 7,5), 2,0 ml de 2-propanol, 4,0 ml de producto crudo (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo (pureza enantiomérica >99%), 1,0 mg de NAD y 250 mg de células congeladas de *E. coli* RB 791, que contenían la oxidorreductasa de SEQ ID NO: 8 (según los ejemplo 2 y 3) a 40ºC. Después de 24 horas, >90% del (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo usado se había reducido a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo. El exceso diastereomérico ascendía a >99%.

Ejemplo 8

Síntesis de (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo a partir de (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo por medio de la oxidorreductasa de SEQ ID NO: 11

Para la conversión del (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo se incubó en un tubo Eppendorf una mezcla de 350 µl de tampón (tampón fosfato de potasio 100 mM, pH = 7), 150 µl de 2-propanol, 50 µl de producto crudo (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo (pureza enantiomérica >99%), 0,025 mg de NAD y 15 µl de suspensión enzimática de SEQ ID NO: 11 (véase el ejemplo 3) durante 48 horas a temperatura ambiente con agitación continua. Después de 48 h, >80% del (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo usado se había reducido a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo. El exceso diastereomérico ascendía a >99%.

Lista de secuencias

SEQ ID NO:1

```
  1 mlegkvavit gagsgigrat alrfaregar vvvaelderr
 41 geevvreile sggeavfvrt dvsefeqvea averaveeyg
 81 tldvmfnnag ighyaplleh dpehydrvvr vnqygvyygi
121 laagrkmael enpgviinta svyaflaspg vigyhaskga
161 vkmmtqaaal elaphgirvv aiapggvdtp iiqgykdmgl
201 gerlargqmr rrlqtpeqia gavvllatee adaingsvvm
241 tddgyaefk
```

SEQ ID NO:2

```
  1 atgctcgaggggaaggtcgcggtcatcacgggggccggca
 41 gcggcataggccgggccaccgcgctcaggttcgcccgcga
 81 aggggcccgggtggtcgtggcggagctcgacgagcggagg
121 ggggaggaggtcgtccgggagatcctcgagtccggcgggg
161 aggccgtcttcgtgaggacggacgtctcggagttcgagca
201 ggttgaggccgccgtcgagcgcgccgtcgaggagtacggg
241 acgctggacgtcatgttcaacaacgccggcatcgggcact
281 acgcccccctgctggagcacgacccggagcactacgaccg
321 ggtggtccgggtgaaccagtacggcgtctactacgggata
361 ctcgccgccggcaggaagatggccgagctggagaaccccg
401 gcgtgatcatcaacaccgcctcggtctacgctttcctggc
441 ctccccccggtgtgatcggctatcacgcttccaagggggcg
481 gtgaagatgatgacccaggccgcagccctggagctcgccc
521 cccacggcatacgggtcgtcgccatcgccccgggcggggt
561 ggacaccccgatcatccagggctacaaggacatgggcctc
601 ggtgagcggctggcccgcggccagatgcgtcgcaggctcc
641 agacccccgagcagatcgccggcgccgtcgtcctgctcgc
681 caccgaggaggcagacgccataaacggctcggtggtgatg
721 accgacgacggctacgcggagttcaagtaa
```

SEQ ID NO: 3

```
  1 atgctggaag gtaaagtggc agtcatcacc ggtgcaggca
 41 gcggcattgg gcgtgccact gcgctgcgtt ttgcgcgtga
 81 aggcgctcgc gtcgttgtgg ccgagctgga tgaacgtcgc
121 ggtgaggaag ttgtacgtga gattctggaa tctggcgggg
161 gggaggccgt cttcgtgagg acggacgtct cggagttcga
```

```
201 gcaggttgag gccgccgtcg agcgcgccgt cgaggagtac
241 gggacgctgg acgtcatgtt caacaacgcc ggcatcgggc
281 actacgcccc cctgctggag cacgacccgg agcactacga
321 ccgggtggtc cgggtgaacc agtacggcgt ctactacggg
361 atactcgccg ccggcaggaa gatggccgag ctggagaacc
401 ccggcgtgat catcaacacc gcctcggtct acgctttcct
441 ggcctccccc ggtgtgatcg gctatcacgc ttccaagggg
481 gcggtgaaga tgatgaccca ggccgcagcc ctggagctcg
521 ccccccacgg catacgggtc gtcgccatcg ccccgggcgg
561 ggtggacacc ccgatcatcc agggctacaa ggacatgggc
601 ctcggtgagc ggctggcccg cggccagatg cgtcgcaggc
641 tccagacccc cgagcagatc gccggcgccg tcgtcctgct
681 cgccaccgag gaggcagacg ccataaacgg ctcggtggtg
721 atgaccgacg acggctacgc ggagttcaag taa
```

SEQ ID NO:4

GGGAATTCCATATGATGCTCGAGGGGAAGGTCG

SEQ ID NO:5

CCCAAGCTTATTACTTGAACTCCGCGTAGCCGTC

SEQ ID NO:6

CCTAGCTAGCATGCTGGAAGGTAAAGTGGC

SEQ ID NO:7

CACATGCATGCGAATGCTCGAGGGGAAGGTC

SEQ ID NO:8

Geobacillus thermodenitrificans DSM 465. Secuencia de proteína de carbonilreductasa

```
  1 mrlkgkaaiv tggasgigra tairfaeega kvavsdinee ggeetvrlir ekggeaifvq
 61 tdvadskqvs rlvqtavdaf gglhilfnna gighsevrst dlseeewdrv invnlkgvfl
121 gikyavpvmk qcgggaivnt ssllgikgkk yesaynaska gvilltknaa leygkfnirv
181 naiapgvidt niitpwkqde rkwpiiskan algrigtpee vanavlflas deasfitgat
241 lsvdgggltf
```

SEQ ID NO:9

Geobacillus thermodenitrificans DSM 465. Secuencia de ácido nucleico de carbonilreductasa

```
  1  atgaggctaa aaggaaaagc ggcgattgtc accggcggcg cgagcggcat cggccgggcg
 61  acggcgattc gctttgcgga agaaggcgcc aaagtggcgg tgagcgacat caatgaggaa
121  ggaggggaag aaacggtccg cctgattcgg gaaaaaggag gggaggcgat ttttgtccaa
181  acggacgtag ccgattccaa gcaagtgagc cgccttgtcc aaacggcggt tgatgccttt
241  ggcggcctac atattctctt taacaatgcc ggcatcggcc attcggaagt gcggagcacc
301  gacttgtctg aagaagagtg ggaccgggtc atcaacgtta atttgaaagg agtgttcctt
361  ggcatcaaat acgcggtgcc cgtgatgaag caatgcggtg gcggggccat tgtcaacaca
421  tcgagcctgc ttggaatcaa agggaaaaag tacgaatcgg cctacaacgc ctcgaaggcc
481  ggggtgattt tgttgacgaa aaatgcagca ttggaatatg ggaagtttaa cattcgcgtc
541  aatgccattg caccgggggt cattgatacg aacatcatca cgccgtggaa acaagatgag
601  cgcaaatggc cgatcatttc gaaagcgaac gccctcggcc gcatcgggac gccagaggaa
661  gtggcgaacg cggtgttgtt tttggcgtcc gatgaagcgt cgtttatcac cggcgcgaca
721  ttgtcggtcg acggcggcgg gctgacgttt tag
```

SEQ ID NO:10

Geobacillus thermodenitrificans DSM 465. Secuencia de ácido nucleico de gen sintético

```
  1  atgcgcctga aagggaaagc ggcaattgtg acgggtggcg ccagcggcat cgggcgcgcg
 61  actgcgatcc gttttgcaga agagggtgcg aaagttgccg ttagcgacat taacgaggaa
121  ggcggtgagg aaaccgttcg cctgatccgt gaaaaaggcg gtgaggcaat cttcgtgcag
181  acggatgtgg ccgactcaaa acaggtatct cgtctggttc agaccgcggt cgacgcgttt
241  ggtggcctgc acatcctgtt caataacgcc ggcattggcc atagcgaagt gcgtagtact
301  gatctgagcg aggaagagtg ggatcgcgtg attaacgtga acctgaaagg tgtgtttctg
361  ggtattaagt atgcagtccc tgttatgaaa cagtgtggcg gtggtgcgat tgtgaatacc
421  tctagtctgt tgggaatcaa agggaaaaag tatgaatcgg cctacaacgc atcgaaagcc
481  ggcgtcatcc tgctgaccaa aaatgcggcc ctggagtatg gcaagttcaa tattcgtgtc
541  aacgcgatcg ctccaggcgt tatcgatacc aacatcatta caccgtggaa gcaagatgaa
601  cgcaagtggc cgattatctc caaagctaat gcgctgggcc gtatcggtac gccggaagaa
661  gtggctaatg cggttctgtt tctggcaagc gacgaagcga gctttattac gggtgcaacc
721  ctctccgtag atgggggcgg gttaaccttc taa
```

SEQ ID NO:11

Chloroflexus auratiacus DSMZ 635. Secuencia de proteína de carbonilreductasa

```
  1  meppfigkva lvtgaaagig rasalafare gakvvvadvn veggeetial cralntdamf
 61  vrcdvsqrde verlialavd tfgridfahn nagiegvqam ladypeevwd rvieinlkgv
121  wlcmkyeirh mlkqggaiv ntssvaglag srgvsayvas khgivgitka aaleyarngi
181  rvnaicpgti htamidrftq gdpqllaqfa egepigrlgs peevanaviw lcsdkasfvt
241  gatlavdggr la
```

SEQ ID NO:12

Chloroflexus auratiacus DSMZ 635. Secuencia de ácido nucleico de carbonilreductasa

```
  1  atggagccac ctttcattgg gaaggttgcg ctggtcaccg gcgcagcagc cggtattggt
 61  cgtgcttcag cactggcgtt tgcccgtgag ggtgccaagg ttgtcgttgc tgatgtgaat
121  gtcgagggcg gggaagagac gattgcgctg tgtcgggctt tgaataccga tgcaatgttc
181  gtgcgttgtg atgtttcgca acgcgatgaa gtggagcgat taattgctct ggcagttgac
241  acgttcggtc ggatcgactt tgcgcacaac aacgccggga ttgaaggcgt gcaggcaatg
301  ctggccgatt atcccgaaga ggtctgggat cgggtgatcg agatcaacct caaaggggtc
361  tggttgtgta tgaagtacga aatccggcac atgctcaagc agggtggcgg tgcgattgtg
421  aatacctcat cggtcgccgg tctggccgga tcacgtggcg tttcggcgta tgtagccagc
481  aagcacggta ttgttggtat taccaaagcg gcagcccttg agtatgcgcg taacggtatt
541  cgtgtcaacg caatctgtcc aggtacgatt catactgcga tgatcgaccg ctttacccag
601  ggtgatcccc aactgcttgc ccagttcgct gagggtgaac cgattggtcg gctcggctcg
661  cctgaagagg tcgccaatgc ggtgatctgg ctctgctcag ataaggcttc gtttgtgacc
721  ggagcgacac tggcggttga tggtggccgc ctggcgtaa
```

SEQ ID NO:13

Chloroflexus auratiacus DSMZ 635. Secuencia de ácido nucleico de gen sintético

```
  1  atggagcccc catttatcgg gaaagttgcg ttagttacgg gggcagcggc agggatcggc
 61  agggcgagtg ccctggcgtt tgctagagaa ggggccaagg tcgttgtggc agacgttaac
121  gtagagggtg gcgaagagac aattgcttta tgcagagctc tcaacactga tgccatgttc
181  gtccgctgtg atgtgtcaca gcgagacgaa gtcgaaaggc taatcgccct agcggtagac
241  acattcggcc gtattgactt tgctcataat aacgcgggca tagagggagt acaagcaatg
301  ttggctgact atcctgagga agtatgggat cgagtaattg aaatcaatct caaggggtt
361  tggctgtgta tgaagtacga aataaggcac atgctcaagc aaggtggcgg agcgatcgta
421  aacactagct ctgtcgccgg tctagcagga tctcgggggg tttccgcata cgtcgcctcg
481  aaacacggca ttgtagggat taccaaagct gcagcccttg agtatgcccg aaatggaata
541  agagtgaatg ctatctgccc aggcacaata catactgcaa tgatagatcg gtttacgcag
601  ggtgatccgc aacttttggc gcagttcgcc gaaggtgagc ctataggtcg ccttggtagc
661  ccggaagagg tcgctaatgc ggtgatttgg ttgtgttcag acaaagcaag tttcgtgacg
721  ggagctaccc tggcagtgga tggaggacgt ttagct
```

SEQ ID NO:14

Candida magnoliae CBS 6396. Secuencia de proteína de carbonilreductasa

```
  1  msatsnalit gasrgmgeat aiklalegys vtlasrgieq lnaikeklpi vkkgqqhyvw
 61  qldlsdieaa stfkgaplpa ssydvffsna gvvdfapfad qsetaqkdlf tvnllspval
121  tktivkaiad kpretpahii ftssivgirg vpnvavysat kgaidsfars larefgpkni
181  hvncvnpgtt rtemtkgvdl aafgdvpikg wievdaiada vlflikskni tgqslvvdng
241  fgv
```

SEQ ID NO:15

Candida magnoliae CBS 6396. Secuencia de ácido nucleico de carbonilreductasa

```
  1  atgtctgcta cttcgaacgc tcttatcact ggtgccagcc gcggaatggg cgaggccaca
 61  gctattaagc ttgcccttga ggggtacagc gtcacccttg catcacgcgg tattgagcag
121  ctcaatgcca tcaaggaaaa actacccatc gtgaagaagg gccagcagca ctacgtttgg
181  cagctcgatc ttagtgacat cgaggcggct tccaccttca agggggctcc tctgcctgcc
241  agcagctacg acgtgttctt cagcaacgcc ggtgtggtgg actttgctcc gttcgcagac
301  caaagcgaga ctgcgcaaaa ggacctgttc acggttaacc tgctgtcgcc tgttgcgttg
361  accaagacca ttgttaaggc catcgccgac aagccccgcg agacgcctgc tcacattatc
421  ttcacctcgt ccattgtcgg aattcgcggt gttcccaacg tggcggtcta cagcgccacc
481  aagggcgcga ttgacagctt tgcgcgctcg cttgctcgtg agttcggtcc caagaacatc
541  cacgttaact gcgtgaaccc gggcacgacg cgcaccgaga tgacaaaggg cgttgatctc
601  gcggctttcg gcgatgttcc tatcaagggc tggatcgagg tcgatgcgat tgccgacgct
661  gtgctgtttt tgatcaagtc caagaacatc actggccagt cgctcgttgt tgacaacgga
721  ttcggtgttt aa
```

Lista de secuencias

<110> IEP GmbH

<120> Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de compuestos hidroxiceto

<130> I 9844

<150> AT A 2027/2005
<151> 2005-12-19

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 249
<212> PRT
<213> Rubrobacter xylanophilus DSM 9941

<400> 1

```
Met Leu Glu Gly Lys Val Ala Val Ile Thr Gly Ala Gly Ser Gly Ile
1               5                   10                  15

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

Ala Ala Glu Leu Asp Glu Arg Gly Gly Glu Gly Val Val Arg Glu Val
        35                  40                  45

Arg Ser Leu Gly Gly Glu Ala Val Phe Val Arg Thr Asp Val Ser Glu
    50                  55                  60

Phe Ala Gln Val Glu Asp Ala Val Glu Arg Ala Val Gly Glu Tyr Gly
65                  70                  75                  80

Thr Leu Asp Val Met Phe Asn Asn Ala Gly Ile Gly His Tyr Ala Pro
                85                  90                  95

Leu Leu Glu His Glu Pro Glu His Tyr Asp Arg Val Val Arg Val Asn
            100                 105                 110

Gln Tyr Gly Val Tyr Tyr Gly Ile Leu Ala Ala Gly Arg Lys Met Val
        115                 120                 125
```

Ala Leu Lys Asn Pro Gly Leu Ile Ile Asn Thr Ala Ser Val Tyr Ala
130 135 140

Phe Leu Ala Ser Pro Gly Val Ile Gly Tyr His Ala Ala Lys Gly Ala
145 150 155 160

Val Lys Met Met Thr Gln Ala Ala Ala Leu Glu Leu Ala Pro His Gly
165 170 175

Ile Arg Val Val Ala Ile Ala Pro Gly Gly Val Asp Thr Pro Ile Ile
180 185 190

Gln Gly Tyr Lys Asp Met Gly Leu Gly Glu Arg Leu Ala Arg Gly Gln
195 200 205

Met Arg Arg Arg Leu Gln Thr Pro Glu Gln Ile Ala Gly Ala Val Ala
210 215 220

Leu Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Ala Ile Asn Gly Ser Val Val Met
225 230 235 240

Thr Asp Asp Gly Tyr Ala Glu Phe Lys
245

<210> 2
<211> 750
<212> ADN
<213> Rubrobacter xylanophilus DSM 9941

<400> 2
atgctcgagg ggaaggtcgc ggtcatcacg ggggccggaa gcggcatagg ccgggccacc 60
gcgctcaagt tcgcccgcga gggggcccgg gtcgtcgccg ccgagctcga cgagcgcggc 120
ggggaggggg tggtccggga ggtgcgcagc ctcgggggcg aggcggtctt cgtccggacc 180
gacgtctcgg agttcgcgca ggtggaggac gccgtcgagc gggcggtcgg ggagtacggc 240
accctcgacg tgatgttcaa caacgccggc atcgggcact acgccccccct gctggagcac 300
gagcccgagc actacgaccg ggtggtccgg gtgaaccagt acggcgtcta ctacgggata 360
ctcgccgccg ggagaaagat ggtcgccctg aagaaccccg gcttgatcat caacaccgcc 420
tcggtctacg ccttcctcgc ctcgccgggg gtcatcggct accacgccgc caagggggcg 480
gtcaagatga tgacccaggc ggcggcgctg gagctcgccc cgcacggcat aagggtcgtc 540
gccatcgccc cgggcggggt ggacaccccc atcatccagg gctacaagga catggggctc 600
ggcgagaggc tggcccgcgg ccagatgcgc cgccggctcc agacccccga gcagatcgcc 660
ggggcggtcg ccctgctcgc caccgacgag gccgacgcca taaacggctc ggtggtcatg 720
accgacgacg gctacgcgga gttcaagtag 750

<210> 3
<211> 750
<212> ADN
<213> Construcción sintética

<400> 3

atgctggaag gtaaagtggc agtcatcacc ggtgcaggca gcggcattgg gcgtgccact 60

gcgctgcgtt ttgcgcgtga aggcgctcgc gtcgttgtgg ccgagctgga tgaacgtcgc 120

ggtgaggaag ttgtacgtga gattctggaa tccggtggcg aagccgtgtt tgtccgcacc 180

gacgtgtctg aattcgagca agtcgaagcg gcagttgaac gtgcagtcga agagtacggc 240

accctggatg tgatgttcaa caatgcgggt attgggcatt acgctccgct gttagaacat 300

gacccagagc actatgatcg cgtggtacgt gtaaatcagt atggtgtgta ttacggaatc 360

ctggcagccg gccgtaaaat ggccgaactg gaaaatccgg gcgttatcat taacaccgca 420

agtgtgtacg cgtttctggc tagcccgggg gtgatcggct accatgcctc aaagggtgct 480

gtgaaaatga tgacgcaggc tgcggccctg gaattggctc cgcacggcat ccgagttgtc 540

gcgatcgccc cgggggggcgt cgacacccct attatccaag gttataaaga tatgggcctg 600

ggtgaacgct tggcgcgtgg tcagatgcgg cgtcgcctgc agactccgga acagattgcg 660

ggtgcagttg tgttactggc taccgaagag gcggacgcga ttaacggttc ggtcgttatg 720

actgatgatg ggtatgcgga gtttaaataa 750

<210> 4
<211> 33
<212> ADN
<213> Construcción sintética

<400> 4
gggaattcca tatgatgctc gaggggaagg tcg 33

<210> 5
<211> 34
<212> ADN
<213> Construcción sintética

<400> 5
cccaagctta ttacttgaac tccgcgtagc cgtc 34

<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Construcción sintética

<400> 6
cctagctagc atgctggaag gtaaagtggc 30

<210> 7
<211> 31
<212> ADN
<213> Construcción sintética

<400> 7
cacatgcatg cgaatgctcg aggggaaggt c 31

<210> 8
<211> 250
<212> PRT
<213> Geobacillus thermodenitrificans DSM 465

<400> 8

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

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

Ala Val Ser Asp Ile Asn Glu Glu Gly Gly Glu Glu Thr Val Arg Leu
35 40 45

Ile Arg Glu Lys Gly Gly Glu Ala Ile Phe Val Gln Thr Asp Val Ala
50 55 60

Asp Ser Lys Gln Val Ser Arg Leu Val Gln Thr Ala Val Asp Ala Phe
65 70 75 80

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

Val Arg Ser Thr Asp Leu Ser Glu Glu Glu Trp Asp Arg Val Ile Asn
100 105 110

Val Asn Leu Lys Gly Val Phe Leu Gly Ile Lys Tyr Ala Val Pro Val
115 120 125

Met Lys Gln Cys Gly Gly Gly Ala Ile Val Asn Thr Ser Ser Leu Leu
130 135 140

Gly Ile Lys Gly Lys Lys Tyr Glu Ser Ala Tyr Asn Ala Ser Lys Ala
145 150 155 160

Gly Val Ile Leu Leu Thr Lys Asn Ala Ala Leu Glu Tyr Gly Lys Phe
165 170 175

Asn Ile Arg Val Asn Ala Ile Ala Pro Gly Val Ile Asp Thr Asn Ile
180 185 190

Ile Thr Pro Trp Lys Gln Asp Glu Arg Lys Trp Pro Ile Ile Ser Lys
195 200 205

Ala Asn Ala Leu Gly Arg Ile Gly Thr Pro Glu Glu Val Ala Asn Ala
210 215 220

Val Leu Phe Leu Ala Ser Asp Glu Ala Ser Phe Ile Thr Gly Ala Thr
225 230 235 240

Leu Ser Val Asp Gly Gly Gly Leu Thr Phe
245 250

<210> 9
<211> 753
<212> ADN
<213> Geobacillus thermodenitrificans DSM 465

<400> 9
atgaggctaa aaggaaaagc ggcgattgtc accggcggcg cgagcggcat cggccgggcg 60

acggcgattc gctttgcgga agaaggcgcc aaagtggcgg tgagcgacat caatgaggaa 120

ggaggggaag aaacggtccg cctgattcgg gaaaaaggag gggaggcgat ttttgtccaa 180

acggacgtag ccgattccaa gcaagtgagc cgccttgtcc aaacggcggt tgatgccttt 240
ggcggcctac atattctctt taacaatgcc ggcatcggcc attcggaagt gcggagcacc 300
gacttgtctg aagaagagtg ggaccgggtc atcaacgtta atttgaaagg agtgttcctt 360
ggcatcaaat acgcggtgcc cgtgatgaag caatgcggtg gcggggccat tgtcaacaca 420
tcgagcctgc ttggaatcaa agggaaaaag tacgaatcgg cctacaacgc ctcgaaggcc 480
ggggtgattt tgttgacgaa aaatgcagca ttggaatatg ggaagtttaa cattcgcgtc 540
aatgccattg caccgggggt cattgatacg aacatcatca cgccgtggaa acaagatgag 600
cgcaaatggc cgatcatttc gaaagcgaac gccctcggcc gcatcgggac gccagaggaa 660
gtggcgaacg cggtgttgtt tttggcgtcc gatgaagcgt cgtttatcac cggcgcgaca 720
ttgtcggtcg acggcggcgg gctgacgttt tag 753

<210> 10
<211> 753
<212> ADN
<213> Construcción sintética

<400> 10
atgcgcctga aagggaaagc ggcaattgtg acgggtggcg ccagcggcat cgggcgcgcg 60
actgcgatcc gttttgcaga agagggtgcg aaagttgccg ttagcgacat taacgaggaa 120
ggcggtgagg aaaccgttcg cctgatccgt gaaaaaggcg gtgaggcaat cttcgtgcag 180
acggatgtgg ccgactcaaa acaggtatct cgtctggttc agaccgcggt cgacgcgttt 240
ggtggcctgc acatcctgtt caataacgcc ggcattggcc atagcgaagt gcgtagtact 300
gatctgagcg aggaagagtg ggatcgcgtg attaacgtga acctgaaagg tgtgtttctg 360
ggtattaagt atgcagtccc tgttatgaaa cagtgtggcg gtggtgcgat tgtgaatacc 420
tctagtctgt tgggaatcaa agggaaaaag tatgaatcgg cctacaacgc atcgaaagcc 480
ggcgtcatcc tgctgaccaa aaatgcggcc ctggagtatg gcaagttcaa tattcgtgtc 540
aacgcgatcg ctccaggcgt tatcgatacc aacatcatta caccgtggaa gcaagatgaa 600
cgcaagtggc cgattatctc caaagctaat gcgctgggcc gtatcggtac gccggaagaa 660
gtggctaatg cggttctgtt tctggcaagc gacgaagcga gctttattac gggtgcaacc 720
ctctccgtag atgggggcgg gttaaccttc taa 753

<210> 11
<211> 252
<212> PRT
<213> Chloroflexus aurantiacus DSM 635

<400> 11
Met Glu Pro Pro Phe Ile Gly Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Ala
1 5 10 15

Ala Gly Ile Gly Arg Ala Ser Ala Leu Ala Phe Ala Arg Glu Gly Ala
20 25 30

Lys Val Val Val Ala Asp Val Asn Val Glu Gly Gly Glu Glu Thr Ile
35 40 45

Ala Leu Cys Arg Ala Leu Asn Thr Asp Ala Met Phe Val Arg Cys Asp
50 55 60

Val Ser Gln Arg Asp Glu Val Glu Arg Leu Ile Ala Leu Ala Val Asp
65 70 75 80

Thr Phe Gly Arg Ile Asp Phe Ala His Asn Asn Ala Gly Ile Glu Gly
85 90 95

Val Gln Ala Met Leu Ala Asp Tyr Pro Glu Glu Val Trp Asp Arg Val
100 105 110

Ile Glu Ile Asn Leu Lys Gly Val Trp Leu Cys Met Lys Tyr Glu Ile
115 120 125

Arg His Met Leu Lys Gln Gly Gly Gly Ala Ile Val Asn Thr Ser Ser
130 135 140

Val Ala Gly Leu Ala Gly Ser Arg Gly Val Ser Ala Tyr Val Ala Ser
145 150 155 160

Lys His Gly Ile Val Gly Ile Thr Lys Ala Ala Ala Leu Glu Tyr Ala
165 170 175

Arg Asn Gly Ile Arg Val Asn Ala Ile Cys Pro Gly Thr Ile His Thr
180 185 190

Ala Met Ile Asp Arg Phe Thr Gln Gly Asp Pro Gln Leu Leu Ala Gln
195 200 205

Phe Ala Glu Gly Glu Pro Ile Gly Arg Leu Gly Ser Pro Glu Glu Val
210 215 220

Ala Asn Ala Val Ile Trp Leu Cys Ser Asp Lys Ala Ser Phe Val Thr
225 230 235 240

Gly Ala Thr Leu Ala Val Asp Gly Gly Arg Leu Ala
245 250

<210> 12
<211> 759
<212> ADN
<213> Chloroflexus aurantiacus DSM 635

<400> 12
atggagccac ctttcattgg gaaggttgcg ctggtcaccg gcgcagcagc cggtattggt 60

cgtgcttcag cactggcgtt tgcccgtgag ggtgccaagg ttgtcgttgc tgatgtgaat 120

gtcgagggcg gggaagagac gattgcgctg tgtcgggctt tgaataccga tgcaatgttc 180

gtgcgttgtg atgtttcgca acgcgatgaa gtggagcgat taattgctct ggcagttgac 240

acgttcggtc ggatcgactt tgcgcacaac aacgccggga ttgaaggcgt gcaggcaatg 300

ctggccgatt atcccgaaga ggtctgggat cgggtgatcg agatcaacct caaaggggtc 360

tggttgtgta tgaagtacga aatccggcac atgctcaagc agggtggcgg tgcgattgtg 420

aatacctcat cggtcgccgg tctggccgga tcacgtggcg tttcggcgta tgtagccagc 480

aagcacggta ttgttggtat taccaaagcg gcagcccttg agtatgcgcg taacggtatt 540

cgtgtcaacg caatctgtcc aggtacgatt catactgcga tgatcgaccg ctttacccag 600

ggtgatcccc aactgcttgc ccagttcgct gagggtgaac cgattggtcg gctcggctcg 660

cctgaagagg tcgccaatgc ggtgatctgg ctctgctcag ataaggcttc gtttgtgacc 720

ggagcgacac tggcggttga tggtggccgc ctggcgtaa 759

<210> 13
<211> 759
<212> ADN
<213> Construcción sintética

<400> 13
atggagcccc catttatcgg gaaagttgcg ttagttacgg gggcagcggc agggatcggc 60

agggcgagtg ccctggcgtt tgctagagaa ggggccaagg tcgttgtggc agacgttaac 120

gtagagggtg gcgaagagac aattgcttta tgcagagctc tcaacactga tgccatgttc 180

gtccgctgtg atgtgtcaca gcgagacgaa gtcgaaaggc taatcgccct agcggtagac 240

acattcggcc gtattgactt tgctcataat aacgcgggca tagagggagt acaagcaatg 300

ttggctgact atcctgagga agtatgggat cgagtaattg aaatcaatct caagggggtt 360

tggctgtgta tgaagtacga aataaggcac atgctcaagc aaggtggcgg agcgatcgta 420

aacactagct ctgtcgccgg tctagcagga tctcgggggg tttccgcata cgtcgcctcg 480

aaacacggca ttgtagggat taccaaagct gcagcccttg agtatgcccg aaatggaata 540

agagtgaatg ctatctgccc aggcacaata catactgcaa tgatagatcg gtttacgcag 600

ggtgatccgc aacttttggc gcagttcgcc gaaggtgagc ctataggtcg ccttggtagc 660

ccggaagagg tcgctaatgc ggtgatttgg ttgtgttcag acaaagcaag tttcgtgacg 720

ggagctaccc tggcagtgga tggaggacgt ttagcttaa 759

<210> 14
<211> 243
<212> PRT
<213> Candida magnoliae CBS 6396

<400> 14
Met Ser Ala Thr Ser Asn Ala Leu Ile Thr Gly Ala Ser Arg Gly Met
1 5 10 15

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

Leu Ala Ser Arg Gly Ile Glu Gln Leu Asn Ala Ile Lys Glu Lys Leu
35 40 45

Pro Ile Val Lys Lys Gly Gln Gln His Tyr Val Trp Gln Leu Asp Leu
50 55 60

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

Ser Ser Tyr Asp Val Phe Phe Ser Asn Ala Gly Val Val Asp Phe Ala
85 90 95

Pro Phe Ala Asp Gln Ser Glu Thr Ala Gln Lys Asp Leu Phe Thr Val
100 105 110

Asn Leu Leu Ser Pro Val Ala Leu Thr Lys Thr Ile Val Lys Ala Ile
115 120 125

Ala Asp Lys Pro Arg Glu Thr Pro Ala His Ile Ile Phe Thr Ser Ser
130 135 140

Ile Val Gly Ile Arg Gly Val Pro Asn Val Ala Val Tyr Ser Ala Thr
145 150 155 160

Lys Gly Ala Ile Asp Ser Phe Ala Arg Ser Leu Ala Arg Glu Phe Gly
165 170 175

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

Glu Met Thr Lys Gly Val Asp Leu Ala Ala Phe Gly Asp Val Pro Ile
195 200 205

Lys Gly Trp Ile Glu Val Asp Ala Ile Ala Asp Ala Val Leu Phe Leu
210 215 220

Ile Lys Ser Lys Asn Ile Thr Gly Gln Ser Leu Val Val Asp Asn Gly
225 230 235 240

Phe Gly Val

<210> 15
<211> 732
<212> ADN
<213> Candida magnoliae CBS 6396

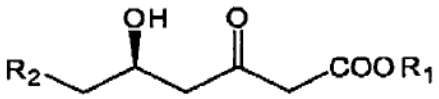
<400> 15
atgtctgcta cttcgaacgc tcttatcact ggtgccagcc gcggaatggg cgaggccaca 60

gctattaagc ttgcccttga ggggtacagc gtcacccttg catcacgcgg tattgagcag 120

```
ctcaatgcca tcaaggaaaa actacccatc gtgaagaagg gccagcagca ctacgtttgg    180
cagctcgatc ttagtgacat cgaggcggct tccaccttca agggggctcc tctgcctgcc    240
agcagctacg acgtgttctt cagcaacgcc ggtgtggtgg actttgctcc gttcgcagac    300
caaagcgaga ctgcgcaaaa ggacctgttc acggttaacc tgctgtcgcc tgttgcgttg    360
accaagacca ttgttaaggc catcgccgac aagccccgcg agacgcctgc tcacattatc    420
ttcacctcgt ccattgtcgg aattcgcggt gttcccaacg tggcggtcta cagcgccacc    480
aagggcgcga ttgacagctt tgcgcgctcg cttgctcgtg agttcggtcc caagaacatc    540
cacgttaact gcgtgaaccc gggcacgacg cgcaccgaga tgacaaaggg cgttgatctc    600
gcggctttcg gcgatgttcc tatcaagggc tggatcgagg tcgatgcgat tgccgacgct    660
gtgctgtttt tgatcaagtc caagaacatc actggccagt cgctcgttgt tgacaacgga    720
ttcggtgttt aa                                                        732
```

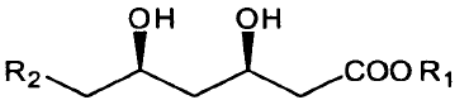
REIVINDICACIONES

1. Proceso para la reducción enzimática enantioselectiva de una hidroxicetona de fórmula general I



(I)

en donde R_1 = alquilo C_1-C_6 y R_2 = -Cl, -CN, -OH, -H o alquilo C_1-C_6,
a un diol quiral de fórmula general II



(II)

en el que R_1 y R_2 tienen el mismo significado que en la fórmula I,
en donde la hidroxicetona se reduce con una oxidorreductasa en presencia de un cofactor, **caracterizado en que**, la oxidorreductasa

a) muestra una secuencia de aminoácidos en la que al menos el 50% de los aminoácidos son idénticos a los de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14, en donde la secuencia de aminoácidos no es *Candida magnoliae* IFO 0705,

b) está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15, o

c) está codificada por una secuencia de ácido nucleico que en condiciones rigurosas hibrida con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15.

2. Proceso según la reivindicación 1, **caracterizado en que** el cofactor se reduce continuamente con un cosustrato.

3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado en que** se usa NAD(P)H como cofactor.

4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado en que** se usa 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-heptanol o 2-octanol como cosustrato y alcohol secundario, respectivamente.

5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado en que** la hidroxicetona se usa en una cantidad del 5-50% en peso, preferiblemente del 8-40% en peso, en particular del 10-25% en peso, referido al volumen total de reacción.

6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado en que** como hidroxicetona de fórmula general (I) se usa (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo o (5S)-5,6-dihidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo.

7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado en que** el TTN ("total turn over number" , número total de recambio = moles de hidroxicetona reducida/moles de cofactor usado) es $\geq 10^3$.

8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado en que** se lleva a cabo en un sistema bifásico acuoso orgánico.

9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado en que** se usa adicionalmente un disolvente orgánico como dietiléter, terc-butilmetil éter, diisopropiléter, dibutiléter, acetato de etilo, acetato de butilo, heptano, hexano o ciclohexano.