

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 907**

51 Int. Cl.:  
**C12P 7/02**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08774090 .8**

96 Fecha de presentación: **16.06.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2171074**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2010**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de alcoholes con actividad óptica bajo empleo de una dehidrogenasa de Azoarcus sp. EbN1**

30 Prioridad:  
**20.06.2007 EP 07110670**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.04.2012**

73 Titular/es:  
**BASF SE  
67056 Ludwigshafen, DE;  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg y  
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der  
Wissenschaften e.V.**

72 Inventor/es:  
**BREUER, Michael;  
RABUS, Ralf y  
HEIDER, Johann**

74 Agente/Representante:  
**Carvajal y Urquijo, Isabel**

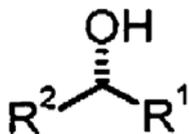
ES 2 377 907 T3

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).

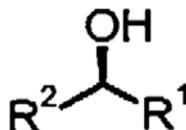
## DESCRIPCION

Procedimiento para la obtención de alcoholes con actividad óptica bajo empleo de una dehidrogenasa de *Azoarcus* sp. EbN1

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de alcoholes con actividad óptica de la fórmula la o lb



Fórmula Ia



Fórmula Ib

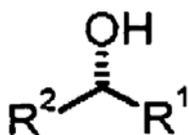
Estado de la técnica

10 La función de dehidrogenasas como biocatalizadores es conocida generalmente [Chemico-Biological Interactions (2003) 143:247, Journal of Biological Chemistry (2002) 277:25677]. En especial se documenta la aplicación técnica de esta clase de enzimas para la obtención de productos químicos finos [Tetrahedron (2004) 60:633, Trends Biotechnol (1999) 17:487]. Según sustrato, las deshidrogenasas conocidas se diferencian en su actividad y especificidad. Respecto a su estereoselectividad se diferencian en los denominados enzimas "Prelog" y "anti-Prelog" (Pure and Applied Chemistry, (1964), 9 : 119). De este modo, para la obtención de derivados de feniletanol con actividad óptica se describen particularmente aquellos biocatalizadores que presentan selectividad "Prelog". Enzimas que presentan la enantioselectividad de sentido opuesto son poco frecuentes, aunque no son desconocidos [Trends Biotechnol (1999) 17:487, J. Org. Chem. (1992) 57:1532].

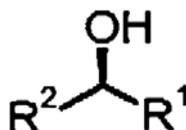
20 La WO 2005/108590 describe un procedimiento para la obtención de alcoholes con actividad óptica a partir de los correspondientes alcoholes mediante reducción enzimática, regenerándose de nuevo los equivalentes de reducción consumidos en el transcurso de la reacción mediante transformación de un alcohol sacrificial en la cetona sacrificial.

La WO 2006/094945 describe un procedimiento para la obtención de alcoholes con actividad óptica de estructura especial mediante reducción de las correspondientes cetonas por medio de una deshidrogenasa a partir de un organismo de la especie *Azoarcus*.

25 La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de alcoholes con actividad óptica de la fórmula la o lb



Fórmula Ia



Fórmula Ib

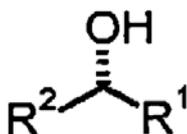
donde

30  $R^1$ ,  $R^2$  representan grupos alquilo, alquenoilo, arilo o alquilarilo, que pueden estar substituidos a su vez una o varias veces por alquilo, halógeno, SH,  $SR^2$ , OH,  $OR^2$ ,  $NO_2$ , CN, CO,  $COOR^2$ ,  $NR^2R^3$  o  $NR^2R^3R^+X$ , representando  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$ , independientemente entre sí, H o un resto alquilo inferior o alcoxi inferior, y representando X' un contraión, con la medida de que  $R^1$  sea diferente a  $R^2$ ,

35 mediante reducción de la correspondiente cetona, llevándose a cabo la reducción con una deshidrogenasa con la secuencia de polipéptidos SEQ ID NO: 2, o con una secuencia de polipéptidos, en la que hasta un 25 % de restos aminoácido frente a SEQ ID NO: 2 se han modificado mediante delección, inserción, sustitución, o una combinación de los mismos.

Una forma especialmente conveniente de ejecución de la invención consiste en un procedimiento para la obtención de alcoholes con actividad óptica de la fórmula la o lb, donde  $R^1$  representa alquilo con 1 a 10 átomos de carbono y  $R^2$  representa fenilo, estando monosubstituidos los restos  $R^1$  y/o  $R^2$ , en caso dado por halógeno.

40 La presente invención se refiere en especial a un procedimiento para la obtención de alcoholes con actividad óptica de la fórmula Ia, siendo válido para  $R^1$  que este resto ocupa menos espacio que  $R^2$ .



Fórmula la

Si el resto  $R^2$  ocupa mas espacio que  $R^1$ , el alcohol según Prelog, V., Pure and Applied Chemistry (1964), 9, 119-130, se clasifica en la categoría "anti-Prelog".

- 5 Alcoholes quirales se pueden diferenciar en los denominados enantiómeros "Prelog" y "Anti-Prelog". La asignación a una o ambas categorías se efectúa según el tamaño (demanda de espacio) de ambos grupos, que son adyacentes al grupo alcohol, y la orientación de la función hidroxil en relación a ambos grupos. Alcoholes con actividad óptica con configuración "anti-Prelog" son importantes precursores para diferentes productos activos.

Conceptos y definiciones generales

- 10 Si no se da ningún otro dato son válidos los siguientes significados generales:

"halógeno" representa flúor, cloro, bromo o yodo, en especial flúor o cloro,

"alquilo inferior" representa restos alquilo de cadena lineal o ramificados con 1 a 6 átomos de carbono, como metilo, etilo, i- o n-propilo, n-, i-, sec- o terc-butilo, n-pentilo o 2-metil-butilo, n-hexilo, 2-metil-pentilo, 3-metil-pentilo, 2-etil-butilo,

- 15 "alqueno inferior" representa los análogos mono- o poliinsaturados, preferentemente mono- o diinsaturados, de restos alquilo con 2 a 6 átomos de carbono citados anteriormente, pudiéndose situar el doble enlace en cualquier posición de la cadena de carbono.

"Alcoxi inferior" representa los análogos terminados en oxígeno de restos alquilo anteriores.

- 20 "Ariilo" representa un resto aromático mono- o polinuclear, preferentemente mono- o dinuclear, en caso dado substituido, en especial fenilo, o un naftilo enlazado a través de cualquier posición de anillo, como 1- o 2-naftilo. Estos restos ariilo pueden portar, en caso dado, 1 o 2 substituyentes iguales o diferentes, a modo de ejemplo halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, según la anterior definición, o trifluormetilo.

- 25 "Enantioselectividad" en el ámbito de la presente invención significa que el exceso enantiomérico ee (en %) de uno de ambos enantiómeros posibles asciende al menos a un 50 %, preferentemente al menos un 80 %, en especial al menos un 90 %, y especialmente al menos un 95 %. El valor ee se calcula según:

$$ee (\%) = \frac{\text{enantiómero A} - \text{enantiómero B}}{(\text{enantiómero A} + \text{enantiómero B})} \times 100$$

Formas de ejecución bioquímicas

- 30 Las deshidrogenasas descritas (EC 1.1.X.X) son deshidrogenasas dependientes de NAD, o bien NADP (E.C.1.1.1.x), en especial deshidrogenasas alcohólicas (E.C.1.1.1.1 o E.C.1.1.1.2), que provocan la reducción selectiva de la cetona para dar el alcohol "anti-Prelog". La deshidrogenasa se obtiene a partir de un microorganismo, especialmente a partir de una bacteria, un hongo, en especial una levadura, depositada respectivamente en colecciones de cepas, u obtenible a partir de aislados de fuentes naturales, como muestras de suelo, muestras de biomasa y similares, o mediante la síntesis de novo-Gen.

- 35 La deshidrogenasa se puede emplear en forma purificada o parcialmente purificada, o en forma del microorganismo original, o de un organismo huésped recombinante, que exprime la deshidrogenasa. Los procedimientos para la obtención y purificación de deshidrogenasas a partir de microorganismos son suficientemente conocidos por el especialista, por ejemplo por 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. Son igualmente conocidos procedimientos recombinantes para la generación de deshidrogenasas, a modo de ejemplo por W. Hummel, K. Abokitse, K. Drauz, C. Rollmann y H. Gröger, Adv. Synth. Catal. 2003, 345, nº 1 + 2, páginas 153-159.

Bacterias apropiadas son, a modo de ejemplo, aquellas de las especies de *Burkholderiales*, *Hydrogenophilales*, *Methylophilales*, *Neisseriales*, *Nitrosomonadales*, *Procabacteriales* o *Rhodocyclales*.

Se describen especialmente deshidrogenasas de la familia de *Rhodocyclaceae*.

- 45 Se describen deshidrogenasas de las especies *Azoarcus Azonexus*, *Azospira*, *Azovibrio*, *Dechloromonas*, *Ferribacterium*, *Petrobacter*, *Propionivibrio*, *Quadricoccus*, *Rhodocyclus*, *Sterolibacterium*, *Thauera* y *Zoogloea*.

Se describen deshidrogenasas de tipos de especies *Azoarcus*.

La reducción con la deshidrogenasa se efectúa habitualmente en presencia de un cofactor apropiado (también denominado co-substrato). Como cofactor para la reducción de la cetona sirve habitualmente NADH y/o NADPH. Además se pueden emplear deshidrogenasas como sistemas celulares, que contienen co-factor inherente, o mediadores redox alternativos (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).

La reducción con la deshidrogenasa se efectúa habitualmente en presencia de un agente reductor apropiado, que regenera el cofactor oxidado en el transcurso de la reducción. Son ejemplos de agentes reductores apropiados azúcares, en especial las hexosas, como glucosa, manosa, fructosa, y/o alcoholes oxidables, en especial etanol, propanol, butanol, pentanol o isopropanol, así como formiato, fosfito, o hidrógeno molecular. Para la oxidación del agente reductor, y vinculado a la misma, para la regeneración del co-enzima, se puede añadir una segunda deshidrogenasa, como por ejemplo deshidrogenasa de glucosa en el caso de empleo de glucosa como agente reductor, fosfitodeshidrogenasa en el caso de empleo de fosfito como agente reductor, o formiato-deshidrogenasa en el caso de empleo de formiato como agente reductor. Este se puede emplear como enzima libre o inmovilizado, o en forma de células libres o inmovilizadas. Su obtención se puede efectuar tanto por separado, como también mediante coexpresión en una cepa de deshidrogenasa (recombinante).

Las deshidrogenasas empleadas según la invención se pueden emplear libres o inmovilizadas. Se entiende por un enzima inmovilizado un enzima que está fijado a un soporte inerte. Materiales soporte apropiados, así como los enzimas inmovilizados sobre los mismos, son conocidos por la EP-A-1149849, la EP-A-1 069 183 y la DE-OS 100193773, así como las citas bibliográficas mencionadas en las mismas. A los materiales soporte apropiados pertenecen, a modo de ejemplo, arcillas, minerales arcillosos, como caolinita, tierras de diatomeas, perlita, dióxido de silicio, óxido de aluminio, carbonato sódico, carbonato de calcio, polvo de celulosa, materiales de intercambio aniónico, polímeros sintéticos, como poliestireno, resinas acrílicas, resinas de fenol-formaldehído, poliuretanos y poliolefinas, como polietileno y polipropileno. Para la obtención de los enzimas soportados, los materiales soporte se emplean habitualmente en una forma finamente dividida, en forma de partículas, siendo preferentes formas porosas. El tamaño de partícula del material soporte asciende habitualmente a no más de 5 mm, en especial no más de 2 mm (línea de tamizado). Análogamente, en el caso de empleo de deshidrogenasa como catalizador de célula completa se puede elegir una forma libre o inmovilizada. Materiales soporte son, por ejemplo, alginato de Ca y Carrageenan. Enzimas, como también células, se pueden reticular también directamente con aldehído glutárico (Cross-linking para dar CLEAs). Se describen procedimientos de inmovilización correspondientes y adicionales, a modo de 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.

La reacción se puede efectuar en medios de reacción acuosos o no acuosos, o en sistemas bifásicos o (micro)emulsiones. En el caso de medios de reacción acuosos se trata preferentemente de disoluciones tamponadas, que presentan generalmente un valor de pH de 4 a 8, preferentemente de 5 a 8. El disolvente acuoso puede contener, además de agua, al menos un alcohol, por ejemplo etanol o isopropanol, o sulfóxido de dimetil.

Se entiende por medios de reacción no acuosos medios de reacción que contienen menos de un 1 % en peso, preferentemente menos de un 0,5 % en peso de agua, referido al peso total del medio de reacción. La reacción se lleva a cabo preferentemente en un disolvente orgánico. Disolventes apropiados son, a modo de ejemplo, hidrocarburos alifáticos, preferentemente con 5 a 8 átomos de carbono, como pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, heptano, octano o ciclooctano, hidrocarburos halogenados alifáticos, preferentemente con uno o dos átomos de carbono, como diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloroetano o tetracloroetano, hidrocarburos aromáticos, como benceno, tolueno, xilenos, clorobenceno o diclorobenceno, éteres alifáticos acíclicos y cíclicos, o alcoholes, preferentemente con 4 a 8 átomos de carbono, como dietiléter, metil-terc-butiléter, etil-terc-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 los mismos.

A modo de ejemplo, la reducción con la deshidrogenasa se lleva a cabo en un medio de reacción acuoso-orgánico, en especial acuoso.

La cetona a reducir se emplea preferentemente en una concentración de 0,1 g/l a 500 g/l, de modo especialmente preferente de 1 g/l a 50 g/l, en la reducción enzimática, y se puede restituir continua o discontinuamente.

La reducción enzimática se efectúa generalmente a una temperatura de reacción por debajo de la temperatura de desactivación de la deshidrogenasa empleada, y preferentemente a al menos -10°C. De modo especialmente preferente, se sitúa en el intervalo de 0 a 100°C, en especial de 15 a 60°C, y especialmente de 20 a 40°C, por ejemplo a aproximadamente 30°C.

Para la puesta en práctica, a modo de ejemplo se puede disponer la cetona con la deshidrogenada, el disolvente, y en caso dado los co-enzimas, en caso dado una segunda deshidrogenasa para la regeneración del co-enzima, y/o otros agentes reductores, y entremezclar la mezcla, por ejemplo mediante agitación o vibración. No obstante, también es posible inmovilizar la(s) deshidrogenasa(s) en un reactor, y conducir a través del reactor una mezcla que contiene la cetona, y en caso dado co-enzimas y/o co-substratos. A tal efecto se puede conducir la mezcla en circuito a través del reactor hasta la conversión deseada. En este caso, el grupo ceto de la cetona se reduce a un

5 grupo OH, produciéndose esencialmente uno de ambos enantiómeros de alcohol. Por regla general, la reducción se lleva a cabo hasta una conversión de al menos un 70 %, de modo especialmente preferente de al menos un 85 %, y en especial de al menos un 95 %, referido a la cetona contenida en la mezcla. El progreso de la reacción, es decir, la reducción secuencial de la cetona, se puede seguir en este caso mediante métodos habituales, como cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta presión.

En el procedimiento según la invención se emplean como dehidrogenasas de modo especialmente preferentes alcohol-dehidrogenasas con las siguientes propiedades:

10 alcohol-dehidrogenasa de Azoarcus con una secuencia de aminoácidos según SEQ ID 2, así como alcohol-dehidrogenasas con secuencias de aminoácidos en las que hasta un 25 %, preferentemente hasta un 15 %, de modo especialmente preferente hasta un 10 %, en especial hasta un 5 % de los restos aminoácido están modificados frente a SEQ ID NO:2 mediante delección, inserción, sustitución o una combinación de las mismas.

Oxidación de alcoholes sencillos, como por ejemplo iso-propanol, butan-2-ol, pentan-2-ol o ciclohexanol para dar el correspondiente carbonilo con reducción simultánea de NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup>.

15 Alcohol-dehidrogenasas que catalizan la reducción en una pureza enantiomérica de al menos un 95 % ee (en presencia de NADH y/o NADPH; a 30°C y pH 7,0).

Otro objeto de la presente invención es también una dehidrogenasa "anti-Prelog" con al menos una de las propiedades indicadas anteriormente.

Las alcohol-dehidrogenasas presentan actividad en presencia de los siguientes disolventes: heptano, hexano, MtBE, n-butanol, butan-2-ol, n-pentanol, pentan-2-ol, pentan-3-ol, DMSO, i-propanol, n-propanol, etanol.

20 Preferentemente poseen un peso molecular en el intervalo de 26 ± 2 kDalton.

Otras modificaciones de dehidrogenasas

Se describen igualmente "equivalentes funcionales" de los enzimas con actividad de dehidrogenasa dados a conocer en concreto, y el empleo de los mismos en los procedimientos según la invención.

25 "Equivalentes funcionales" o análogos de los enzimas dados a conocer concretamente son polipéptidos diferentes a los mismos, que poseen además la actividad biológica deseada, como por ejemplo especificidad de sustrato. A modo de ejemplo se entiende por "equivalentes funcionales" enzimas que reducen de la cetona al correspondiente alcohol "anti-Prelog", y que presentan al menos un 20 %, preferentemente un 50 %, de modo especialmente preferente un 75 %, de modo muy especialmente preferente un 90 % de actividad de un enzima, que comprende una de las secuencias de aminoácido indicadas bajo SEQ ID 2. Además, los equivalentes funcionales son estables  
30 preferentemente entre pH 4 y 10, y poseen ventajosamente un óptimo de pH entre pH 5 y 8, así como un óptimo de temperatura en el intervalo de 20°C a 80°C.

En especial se entiende por "equivalentes funcionales" también mutantes que presentan un aminoácido distinto a los citados concretamente en al menos una posición de secuencia de las secuencias de aminoácido citadas anteriormente, pero poseen a pesar de ello una de las actividades biológicas citadas anteriormente. Por consiguiente  
35 "equivalentes funcionales" comprenden los mutantes obtenibles mediante una o varias adiciones, sustituciones, delecciones y/o inversiones de aminoácido, pudiéndose presentar las citadas modificaciones en cualquier posición de secuencia, en tanto conduzcan a un mutante con el perfil de propiedades. También se da equivalencia funcional cuando la muestra de reactividad entre mutante y polipéptido no modificado coincide cualitativamente, es decir, a modo de ejemplo los mismos sustratos reaccionan con velocidad diferente.

40 Se pueden extraer ejemplos de sustituciones de aminoácido apropiadas de la siguiente tabla:

	Resto original	Ejemplos de sustitución
	Ala	Ser
	Arg	Lys
	Asn	Gln; His
45	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn
	Glu	Asp
	Gly	Pro
50	His	Asn; Gln

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

"Equivalentes funcionales" en el anterior sentido son también "precursores" de los polipéptidos descritos, así como "derivados funcionales" y "sales" de polipéptidos.

En este caso, los "precursores" son etapas previas naturales o sintéticas de polipéptidos con o sin la actividad biológica deseada.

15 Bajo la expresión "sales" se entiende tanto sales de grupos carboxilo, como también sales de adición de ácido de grupos amino de moléculas proteicas. Las sales de grupos carboxilo se pueden obtener de modo conocido en sí, y comprenden sales inorgánicas, como por ejemplo sales de sodio, calcio, amonio, hierro y cinc, así como sales con bases orgánicas, como por ejemplo aminas, como trietanolamina, arginina, lisina, piperidina y similares. Sales de adición de ácido, como por ejemplo sales con ácidos minerales, como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, como ácido acético y ácido oxálico, son igualmente objeto de la invención.

20 Se pueden obtener igualmente "derivados funcionales" de polipéptidos en grupos laterales aminoácido funcionales o en sus extremos N- o C-terminales con ayuda de técnicas conocidas. Tales derivados comprenden, a modo de ejemplo, ésteres alifáticos de grupos ácido carboxílico, amidas de grupos ácido carboxílico, obtenibles mediante reacción con amoniaco o con una amina primaria o secundaria; derivados de N-acilo de grupos amino libres, obtenidos mediante reacción con grupos acilo; o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres, obtenidos mediante reacción con grupos acilo.

25 En el caso de una posible glicosilación de proteínas, los "equivalentes funcionales" comprenden proteínas del tipo descrito anteriormente en forma deglicolizada, o bien glicolizada, así como formas derivadas obtenibles mediante modificación del patrón de glicosilación.

30 Naturalmente, los "equivalentes funcionales" comprenden también polipéptidos que son accesibles a partir de otros organismos, así como variantes que se presentan en la naturaleza. A modo de ejemplo, mediante comparación de secuencias se pueden fijar zonas de regiones de secuencia homólogas, y en ajuste a las pautas concretas de la descripción se pueden determinar enzimas equivalentes.

35 "Equivalentes funcionales" comprenden igualmente fragmentos, preferentemente dominios aislados o motivos secuenciales de polipéptidos, que presentan, por ejemplo, la función biológica deseada.

40 "Equivalentes funcionales" son además proteínas en fusión, que presentan una de las secuencias de polipéptido citadas anteriormente, o equivalentes funcionales derivados de las mismas, y al menos otra secuencia heteróloga, diferente de la misma desde el punto de vista funcional, en enlace funcional N- o C-terminal (es decir, sin merma funcional esencial recíproca de las partes proteicas en fusión). Por ejemplo péptidos señal o enzimas son ejemplos no limitantes de tales secuencias heterólogas.

45 "Equivalentes funcionales" descritos son homólogos de las proteínas dadas a conocer concretamente. Estos poseen al menos un 75 %, en especial al menos un 85 %, como por ejemplo un 90 %, un 95 %, un 97 % o un 99 % de homología respecto a una de las secuencias de aminoácido dadas a conocer 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 significa en especial identidad porcentual de restos aminoácido respecto a la longitud total de una de las secuencias de aminoácido aquí descritas concretamente.

Se pueden generar homólogos de proteínas o polipéptidos mediante mutagénesis, por ejemplo mediante mutación por puntos o acortamiento de la proteína.

50 Se pueden identificar homólogos de proteínas mediante rastreo de bancos combinatorios de mutantes, como por ejemplo mutantes de acortamiento. A modo de ejemplo, se puede generar un banco variegado de variantes proteicas mediante mutagénesis combinatoria en el plano de ácidos nucleicos, como por ejemplo mediante ligazón enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos. Existe una pluralidad de procedimientos que se pueden

emplear para la obtención de bancos de homólogos potenciales a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada se puede llevar a cabo en una instalación automática de síntesis de ADN, y el gen sintético se puede ligar entonces a un vector de expresión apropiado. El empleo de un segmento génico degenerado posibilita la puesta a disposición de todas las secuencias en una mezcla, que codifican el segmento deseado en secuencias proteicas potenciales. Procedimientos para la síntesis de oligonucleótidos degenerados son conocidos por el especialista (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 son conocidas varias técnicas para el rastreo de productos génicos de bancos combinatorios, que se han obtenido mediante mutaciones por puntos o acortamiento, y para el rastreo de bancos de cADN en productos génicos con una propiedad seleccionada. Estas técnicas se pueden adaptar al rastreo rápido de bancos génicos, que se han generado mediante mutagénesis combinatoria de homólogos descritos. Las técnicas empleadas con mayor frecuencia para el rastreo de bancos génicos grandes, que están sujetos a un análisis con rendimiento elevado, comprenden la clonación del banco génico en vectores de expresión replicables, transformación de células apropiadas con el banco de vectores resultantes, y expresión de los genes combinatorios bajo condiciones bajo las cuales se facilita la identificación de la actividad deseada de aislamiento del vector, que codifica el gen, cuyo producto se identificó. Recursive-Ensemble-Mutagenese (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en los bancos, se puede emplear en combinación con los ensayos de rastreo, para identificar homólogos (Arkin y Yourvan (1992) *PNAS* 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering* 6(3): 327-331).

Otros acondicionamientos de secuencias de ácido nucleico codificantes

Es objeto de la descripción el empleo de secuencias de ácido nucleico (secuencias de ADN y ARN de hebra simple y doble, como por ejemplo cDNA y mRNA), que codifican para un enzima con actividad de dehidrogenasa. Son preferentes secuencias de ácido nucleico, que codifican, por ejemplo, para secuencias de aminoácido según SEQ ID 2 o secuencias parciales de las mismas caracterizadas, o secuencias de ácido nucleico según SEQ ID 1, o bien secuencias parciales de las mismas caracterizadas.

Todas las secuencias de ácido nucleico mencionadas en este caso son obtenibles de modo conocido en sí mediante síntesis química a partir de los componentes nucleótidos, como por ejemplo mediante condensación de fragmentos de componentes de ácido nucleico de doble hélice solapantes, complementarios. La síntesis química de oligonucleótidos se puede efectuar, a modo de ejemplo, de manera conocida, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet. 2ª edición, Wiley Press New York, páginas 896-897). La adición de oligonucleótidos sintéticos y el relleno de vacantes con ayuda del fragmento de Klenow de ADN-polimerasa y reacciones de unión, así como procedimientos de clonación generales, se describen en Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

También son objeto de la descripción secuencias de ácido nucleico (secuencias de ADN y AETN de hebra simple y doble, como por ejemplo cADN y mARN), que codifican para uno de los anteriores polipéptidos y sus equivalentes funcionales, que son accesibles, por ejemplo, bajo empleo de análogos de nucleótidos sintéticos.

La descripción se refiere tanto a moléculas de ácido nucleico aisladas, que codifican para polipéptidos, o bien proteínas, o segmentos de los mismos con actividad biológica, como también fragmentos de ácido nucleico que se pueden emplear, por ejemplo, para empleo como sondas de hibridación o cebador para la identificación o amplificación de ácidos nucleicos codificantes.

Las moléculas de ácido nucleico pueden contener además secuencias no traducidas del extremo 3' y/o 5' del sector génico codificante.

La descripción comprende además las moléculas de ácido nucleico complementarias a las secuencias de nucleótido descritas concretamente, o una sección de las mismas.

Las secuencias de nucleótido posibilitan la generación de sondas y cebadores, que son empleables para la identificación y/o clonación de secuencias homólogas en otros tipos de células y organismos. Tales sondas, o bien cebadores, comprenden habitualmente una zona de secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones "estringentes" (véase a continuación) en al menos aproximadamente 12, preferentemente al menos aproximadamente 25, como por ejemplo aproximadamente 40, 50 o 75 nucleótidos sucesivos de una hebra "sentido" de una secuencia de ácido nucleico, o de una correspondientes hebra antisentido.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" se separa de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de ácido nucleico, y además puede estar sensiblemente exenta de otro material celular o medio de cultivo, si se obtiene mediante técnicas recombinantes, o exenta de precursores químicos u otros productos químicos, si se sintetiza químicamente.

Una molécula de ácido nucleico se puede aislar por medio de técnicas standard de biología molecular y la información secuencial puesta a disposición. A modo de ejemplo, se puede aislar cADN a partir de un banco de

cADN apropiado, empleándose una de las secuencias completas dadas a conocer concretamente, o una sección de las mismas como sonda de hibridación y técnicas de hibridación standard (como se describen, por ejemplo, en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Además se puede aislar una molécula de ácido nucleico, que comprende una de las secuencias dadas a conocer o una sección de la misma, mediante reacción en cadena de polimerasa, empleándose los cebadores de oligonucleótido que se elaboraron a base de esta secuencia. El ácido nucleico amplificado de este modo se puede clonar en un vector apropiado, y caracterizar mediante análisis secuencial de ADN. Los oligonucleótidos se pueden obtener además mediante procedimientos de síntesis standard, por ejemplo con un aparato automático de síntesis de ADN.

Las secuencias de ácido nucleico se pueden identificar y aislar en principio a partir de todos los organismos. Ventajosamente se pueden aislar las secuencias de ácido nucleico o los homólogos de las mismas a partir de hongos, levaduras, bacterias arcaicas. Como bacterias cítese bacterias gram-negativas y gram-positivas. Los ácidos nucleicos se obtienen preferentemente a partir de bacterias gram-negativas de  $\alpha$ -proteobacterias,  $\beta$ -proteobacterias o  $\gamma$ -proteobacterias, de modo especialmente preferente a partir de bacterias de las especies de *Burkholderiales*, *Hydrogenaphilales*, *Methylophilales*, *Neisseriales*, *Nitrosomonadales*, *Procabacteriales* o *Rhodocyclales*, de modo muy especialmente preferente a partir de bacterias de la familia de *Rhodocyclaceae*, en especial preferentemente de la especie *Azoarcus*, en especial de tipos *Azoarcus anaerobius*, *Azoarcus buckelii*, *Azoarcus communis*, *Azoarcus evansii*, *Azoarcus indigenes*, *Azoarcus toluclasticus*, *Azoarcus toluyliticus*, *Azoarcus toluvovens*, *Azoarcus sp.*, *Azoarcus sp.22Lin*, *Azoarcus sp.BH72*, *Azoarcus sp.CC-11*, *Azoarcus sp.C1B*, *Azoarcus sp. CR23*, *Azoarcus sp. EB1*, *Azoarcus sp. EBN1*, *Azoarcus sp. FL05*, *Azoarcus sp. HA*, *Azoarcus sp. HxN1*, *Azoarcus sp. mXyN1*, *Azoarcus sp. PbN1*, *Azoarcus sp. PH002*, *Azoarcus sp. T* y *Azoarcus sp. ToN1*.

De modo especialmente preferente se emplean dehidrogenasas de *Azoarcus sp Ebn1*.

Se pueden aislar secuencias de ácido nucleico, a modo de ejemplo, con procedimientos de hibridación habituales o la técnica PCR a partir de otros organismos, por ejemplo a través de bancos genómicos o de cADN. Estas secuencias de ADN hibridan bajo condiciones standard con las secuencias. Para la hibridación se emplean ventajosamente oligonucleótidos cortos de las zonas conservadas, a modo de ejemplo a partir del centro activo, que se pueden determinar a través de comparaciones con una dehidrogenasa de modo conocido por el especialista. No obstante, también se pueden emplear fragmentos más largos de ácidos nucleicos, o las secuencias completas para la hibridación. Estas condiciones standard varían según el ácido nucleico empleado (oligonucleótido, fragmento más largo o secuencia completa), o según tipo de ácido nucleico ADN o ARN que se emplea para la hibridación. A modo de ejemplo, las temperaturas de fusión para híbridos de ADN:ADN se sitúan aproximadamente 10°C por debajo de la de híbridos de ADN:ARN de la misma longitud.

Se debe entender por condiciones standard, a modo de ejemplo según ácido nucleico, temperaturas entre 42 y 58°C en una disolución tampón acuosa con una concentración entre 0,1 y 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM citrato sódico, pH 7,2), o adicionalmente en presencia de un 50 % de formamida, como por ejemplo 42°C en 5 x SSC, 50 % de formamida. Las condiciones de hibridación para híbridos de ADN:ADN se sitúan ventajosamente en 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 20°C y 45°C, preferentemente entre unos 30°C y unos 45°C. Para híbridos de ADN:ARN, las condiciones de hibridación se sitúan ventajosamente en 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 30°C y 55°C, preferentemente entre aproximadamente 45°C y 55°C. Estas temperaturas indicadas para la hibridación son, a modo de ejemplo, valores de temperatura de fusión calculados para un ácido nucleico con una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos y un contenido en G + C de un 50 % en ausencia de formamida. Las condiciones experimentales para la hibridación de ADN se describen en libros de texto pertinentes de genética, como por ejemplo Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, y se pueden calcular según fórmulas conocidas por el especialista, a modo de ejemplo dependiendo de la longitud de ácidos nucleicos, el tipo de híbridos o el contenido en G + C. El especialista puede extraer más informaciones para la hibridación de los siguientes libros de texto: Ausubel et al. (eds), 1985, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York; Hames and 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.

También son objeto de la descripción derivados de las secuencias de ácido nucleico dadas a conocer en concreto, o derivables.

De este modo, otras secuencias de ácido nucleico pueden ser derivadas de Seq ID 1, y diferenciarse de las mismas por adición, sustitución, inserción o delección de uno o varios nucleótidos, pero además codificar para polipéptidos con el perfil de propiedades deseado.

También se describen aquellas secuencias de ácido nucleico que comprenden las denominadas mutaciones mudas, o están modificadas correspondientemente a la utilización de codón de un organismo origen o huésped especial, en comparación con una secuencia citada concretamente, al igual que variantes que se presentan en la naturaleza, como por ejemplo variantes de engarce o variantes alélicas.

Son igualmente objeto de la descripción secuencias obtenibles mediante sustituciones de nucleótido conservadoras (es decir, el respectivo aminoácido se sustituye por un aminoácido de la misma carga, tamaño, polaridad y/o solubilidad).

5 También son objeto de la descripción las moléculas derivadas de los ácidos nucleicos dados a conocer en concreto mediante polimorfismos de secuencia. Estos polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población debido a la variación natural. Estas variaciones naturales ocasionan habitualmente una varianza de un 1 a un 5 % en la secuencia de nucleótidos de un gen.

10 Se debe entender por derivados de una secuencia de ácido nucleico, a modo de ejemplo, variantes alélicas que presentan al menos un 40 % de homología en el plano de aminoácidos derivados, preferentemente al menos un 60 % de homología, de modo muy especialmente preferente al menos un 80, 85, 90, 93, 95 o 98 % de homología a lo largo de la zona secuencial total (respecto a homología en el plano de aminoácidos remítase a las anteriores explicaciones sobre los polipéptidos). Las homologías pueden ser ventajosamente más elevadas a lo largo de zonas parciales de secuencias.

15 Además, se debe entender por derivados también homólogos de las secuencias de ácido nucleico, a modo de ejemplo homólogos fúngicos o bacterianos, secuencias acortadas, ADN o ARN de hebra simple de la secuencia de ADN codificante y no codificante. De este modo, por ejemplo en plano de ADN, poseen una homología de al menos un 40 %, preferentemente de al menos un 60 %, de modo especialmente preferente de al menos un 70 %, de modo muy especialmente preferente de al menos un 80 % a lo largo de la zona total de ADN indicada.

20 Además se debe entender por derivados, a modo de ejemplo, fusiones con promotores. Los promotores, que están antepuestos a las secuencias de nucleótidos indicadas, pueden estar modificados a través de una o varias sustituciones de nucleótido, inserciones, inversiones y/o deleciones, sin que se reduzca la funcionalidad, o bien eficacia de los promotores. Por lo demás, los promotores se pueden intensificar en su eficacia mediante modificación de su secuencia, o substituir completamente por promotores más eficaces, también de organismos ajenos.

25 Se debe entender por derivados también variantes cuya secuencia de nucleótidos se modificaron en la zona de -1 a -1000 bases en sentido ascendente antes del codón inicial, o 0 a 1000 bases en sentido descendente tras el codón final, de modo que la expresión génica y/o la expresión proteica se modifican, preferentemente se aumentan.

30 La descripción comprende además también secuencias de ácido nucleico, que hibridan con secuencias codificantes citadas anteriormente bajo "condiciones estrictas". Estos polinucleótidos se pueden encontrar en el rastreo de bancos genómicos o de cADN, y propagar, en caso dado, a partir de los mismos con cebadores apropiados por medio de PCR, y aislar a continuación, a modo de ejemplo con sondas apropiadas. Además se pueden sintetizar polinucleótidos también por vía química. Se entiende por esta propiedad la capacidad de un poli- u oligonucleótido de enlazarse a una secuencia casi complementaria bajo condiciones estrictas, mientras que bajo estas condiciones se suprimen enlaces inespecíficos entre componentes no complementarios. A tal efecto, las secuencias serán complementarias en un 70-100 %, preferentemente en un 90-100 %. La propiedad de secuencias complementarias de poderse enlazar específicamente entre sí se utiliza, a modo de ejemplo, en la técnica Northern o Southern-Blot, o en el enlace de cebador en PCR o RT-PCR. Habitualmente se emplean a tal efecto oligonucleótidos a partir de una longitud de 30 pares de bases. Se entiende por condiciones estrictas, a modo de ejemplo en la técnica Northern-Blot, el empleo de una disolución de lavado caliente a 50-70°C, preferentemente 60-65°C, a modo de ejemplo 0,1 x tampón SSC con un 0,1 % de SDS (20 x SSC: 3M NaCl, 0,3 M citrato sódico, pH 7,0) para la elución de sondas de cADN hibridadas de manera inespecífica u oligonucleótidos. En este caso, como se ha mencionado anteriormente, los ácidos nucleicos complementarios permanecen unidos entre sí sólo en medida elevada. El ajuste de condiciones estrictas es conocido por el especialista, y se describe, por ejemplo, en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

#### Acondicionamientos de las estructuras

45 Además son objeto de la descripción estructuras de expresión que contienen una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido bajo el control genético de secuencias de ácido nucleico reguladoras; así como vectores, que comprenden al menos uno de estas estructuras de expresión.

50 Tales estructuras comprenden preferentemente un promotor 5'-en sentido ascendente de la secuencia codificante respectiva, y una secuencia de terminación 3'-en sentido descendente, así como, en caso dado, otros elementos reguladores habituales, y precisamente en enlace operativo con la secuencia codificante en cada caso.

55 Se entiende por un "enlace operativo" la disposición secuencial de promotor, secuencia codificante, terminador, y en caso dado otros elementos reguladores, de tal manera que cada uno de los elementos reguladores puede cumplir su función en la expresión de la secuencia codificante según determinación. Son ejemplos de secuencias susceptibles de enlace operativo secuencias Targeting, así como intensificadores, señales de poliadenilación y similares. Otros elementos reguladores comprenden marcadores seleccionables, señales de amplificación, orígenes de replicación y similares. Secuencias reguladoras apropiadas se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185. Academic Press, San Diego, CA (1990). Se debe entender por una estructura de ácido

nucleico en especial aquellos en los que el gen para una dehidrogenasa se enlaza operativa y funcionalmente con una o varias señales de regulación para el control, por ejemplo aumento de la expresión génica.

Adicionalmente a estas secuencias de regulación, la regulación natural de estas secuencias puede estar aún presente antes de los verdaderos genes estructurales, y haberse modificado genéticamente en caso dado, de modo que se interrumpe la regulación natural, y se aumenta la expresión de los genes. No obstante, la estructura de ácido nucleico puede presentar estructura más simple, es decir, que no se insertaron señales de regulación adicionales antes de la secuencia codificante, y no se eliminó el promotor natural con su regulación. En su lugar se muta la secuencia de regulación natural de modo que ya no se efectúa regulación, y se aumenta la expresión génica.

Una estructura de ácido nucleico preferente contiene ventajosamente también una o varias de las secuencias de "engarce" ya mencionadas, enlazadas funcionalmente con el promotor, que posibilitan una expresión elevada de la secuencia de ácidos nucleicos. También en el extremo 3' de secuencias de ADN se pueden insertar secuencias ventajosas adicionales, como otros elementos reguladores o terminadores. Los ácidos nucleicos pueden estar contenidos en una o varias copias en la estructura. En la estructura pueden estar contenidos otros marcadores, como genes complementarios a resistencias antibióticas o auxotropías, en caso dado para la selección sobre la estructura.

Secuencias de regulación ventajosas para el procedimiento según la invención están contenidas, a modo de ejemplo, en promotores como promotor *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *lacI<sup>q</sup>*, T7, T5, T3, *gal*, *trc*, *ara*, *rhaP* (*rhaP<sub>BAD</sub>*), *SP6*, *lambda-P<sub>R</sub>* o *lambda-P<sub>L</sub>*, que se aplican ventajosamente en bacterias gram negativas. Otras secuencias de regulación ventajosas están contenidas, a modo de ejemplo, en los promotores gram-positivos *amy* y *SPO2*, en los promotores de levadura o fúngicos *ADC1*, *MFalpha*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH*. En este contexto son ventajosos también los promotores de piruvato carboxilasa y metanol oxidasa, a modo de ejemplo de *Hansenula*. También se pueden emplear promotores sintéticos para la regulación.

La estructura de ácido nucleico se inserta en un organismo huésped, ventajosamente en un vector, como por ejemplo un plásmido o un fago, que posibilita una expresión óptima de los genes en el huésped. Además de plásmidos y fagos, también se puede entender por vectores todos los demás vectores conocidos por el especialista, es decir, por ejemplo virus, como SV40, CMV, baculovirus y adenovirus, transposones, elementos IS, plásmidos, cósmidos y ADN lineal o circular. Estos vectores se pueden replicar de manera autónoma en el organismo huésped, o se pueden replicar a través de cromosomas. Estos vectores constituyen otro acondicionamiento de la descripción. Plásmidos apropiados se encuentran, a modo de ejemplo, en *E. coli* *pLG338*, *pACYC184*, *p8R322*, *pUC19*, *pUC19*, *pKC30*, *pRep4*, *pHS1*, *pKK223-3*, *pDEH19.2*, *pHS2*, *pPlc236*, *pMBL24*, *pLG200*, *pUR290*, *pIN-III<sup>13</sup>-B1*, *Igt11* o *pEdCl*, 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<sup>+</sup>*, *pBIN19*, *pAK2004* o *pDH51*. Los citados plásmidos representan una pequeña selección de posibles plásmidos. Otros plásmidos son bastante conocidos por el especialista, y se pueden extraer del libro *Cloning Vectors* (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

Para la expresión de otros genes contenidos, la estructura de ácido nucleico contiene ventajosamente de modo adicional secuencias reguladoras 3'- y/o 5'-terminal para el aumento de la expresión, que se seleccionan según organismo huésped seleccionado, y gen o genes para una expresión óptima.

Estas secuencias reguladoras posibilitarán la expresión selectiva de genes y la expresión proteica. Esto puede significar, a modo de ejemplo, según organismo huésped, que el gen se expresa o sobreexpone primero tras inducción, o se expresa y/o sobreexpone inmediatamente.

En este caso, las secuencias, o bien factores de regulación, pueden influir positivamente, de modo preferente, sobre la expresión génica de los genes introducidos, y aumentar la misma de este modo. Así se puede efectuar una intensificación de elementos de regulación, ventajosamente en el plano de transcripción, empleándose señales de transcripción, como promotores y/o "engarces". No obstante, también es posible una intensificación de traslación, mejorándose, a modo de ejemplo, la estabilidad de mRNA.

En otra forma de acondicionamiento del vector, la estructura de ácido nucleico o el vector que contiene ácido nucleico se puede introducir también ventajosamente en forma de un ADN lineal en los microorganismos, e integrar en el genoma del organismo huésped a través de recombinación heteróloga u homóloga. Este ADN lineal puede estar constituido por un vector linealizado, como un plásmido, o sólo por la estructura de ácido nucleico o el ácido nucleico.

Para una expresión óptima de genes heterólogos en organismos es ventajoso modificar las secuencias de ácido nucleico correspondientemente al "codon usage" específico empleado en el organismo. El "codon usage" se puede determinar fácilmente por medio de valoraciones por ordenador de otros genes conocidos del organismo en cuestión.

La obtención de una cassette de expresión se efectúa mediante fusión de un promotor apropiado con una secuencia de nucleótidos codificante apropiada, así como una señal de terminación o poliadenilación. A tal efecto se emplea técnicas de recombinación y clonación de uso común, como se describen, a modo de ejemplo, 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. y Wiley Interscience (1987).

- 5 Para la expresión en un organismo huésped apropiado, la estructura de ácido nucleico, o bien estructura génica recombinante, se inserta en un vector específico del huésped, que posibilita una expresión óptima de genes en el huésped. Los vectores son bastante conocidos por el especialista, y se pueden extraer, a modo de ejemplo, del libro "Cloning Vectors" (Pouwels P.H. et al., ed. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985).

#### Organismos huésped útiles

- 10 Con ayuda de vectores o estructuras son obtenibles microorganismos recombinantes, que están transformados, a modo de ejemplo con al menos un vector, y se pueden emplear para la producción de polipéptidos. Las estructuras recombinantes descritos anteriormente se introducen y exprimen ventajosamente en un sistema huésped apropiado. En este caso se emplean preferentemente los métodos de clonación y transfección comunes conocidos por el especialista, como por ejemplo co-precipitación, fusión de protoplastos, electroporación, transfección retroviral y similares, para llevar a expresión los citados ácidos nucleicos en el respectivo sistema de expresión. Sistemas apropiados se describen, a modo de ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., ed. Wiley Interscience, New York 1997, o Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

- 20 También son obtenibles microorganismos recombinados de manera homóloga. A tal efecto se obtiene un vector que contiene al menos una sección de un gen o de una secuencia codificante, donde se ha introducido, en caso dado, al menos una delección, adición o sustitución de aminoácido para modificar la secuencia, por ejemplo para transformar la misma funcionalmente (vector "Knockout"). La secuencia introducida puede ser también, por ejemplo, un homólogo de un microorganismo análogo, o derivarse de una fuente procedente de mamíferos, levaduras o insectos. El vector empleado para la recombinación homóloga puede estar configurado alternativamente de tal manera que el gen endógeno ha mutado o se ha modificado de otro modo en la recombinación homóloga, pero codifica aún la proteína funcional (por ejemplo, la zona reguladora situada en sentido ascendente puede estar modificada de modo que se varíe la expresión de la proteína endógena). La sección modificada del gen es un vector de recombinación homólogo. La construcción de vectores apropiados para la recombinación homóloga se describe, por ejemplo, en Thomas, K. R. y Capecchi, M. R. (1987) *cell* 51 : 503.

- 30 Como organismos huésped recombinantes para el ácido nucleico o la estructura de ácido nucleico, en principio entran en consideración todos los organismos procariontes o eucariotas. Ventajosamente se emplean como organismos huésped microorganismos, como bacterias, hongos o levaduras. Ventajosamente se emplean bacterias gram-positivas o gram-negativas, preferentemente bacterias de las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Streptomycetaceae o Nocardiaceae, de modo especialmente preferente bacterias de las especies *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Burkholderia*, *Salmonella*, *Agrobacterium* o *Rhodococcus*. Es muy especialmente preferente la especie y tipo *Escherichia coli*. Otras bacterias ventajosas se pueden encontrar además en el grupo de  $\alpha$ -proteobacterias,  $\beta$ -proteobacterias o  $\gamma$ -proteobacterias.

- 40 En este caso, el organismo huésped o los organismos huésped según la descripción contienen preferentemente al menos una de las secuencias de ácido nucleico expuestas en esta descripción, estructuras de ácido nucleico o vectores, que codifican para un enzima con actividad de deshidrogenasa.

- 45 Los organismos empleados en el procedimiento según la invención se desarrollan, o bien cultivan de modo conocido por el especialista según organismo huésped. Por regla general, los microorganismos se cultivan en un medio líquido, que contiene una fuente de carbono, casi siempre en forma de azúcares, una fuente de nitrógeno, casi siempre en forma de fuentes de nitrógeno orgánicas, como extracto de levadura o sales, como sulfato amónico, oligoelementos, como sales de hierro, manganeso, magnesio, y en caso dado vitaminas, a temperaturas entre 0°C y 100°C, preferentemente entre 10°C y 60°C, bajo gasificación de oxígeno. En este caso, el pH del líquido nutriente se puede mantener en un valor fijo, es decir, se puede regular o no durante el cultivo. El cultivo se puede efectuar de manera discontinua, semicontinua o continua. Los nutrientes se pueden disponer al comienzo de la fermentación, o alimentar posteriormente de manera semicontinua o continua. La cetona se puede añadir directamente para el cultivo, o ventajosamente tras cultivo. Los enzimas se pueden aislar a partir de los organismos según el procedimiento descrito en los ejemplos, o emplear como extracto crudo para la reacción.

#### Obtención recombinante de polipéptidos

- 55 Además son objeto de la descripción procedimientos para la obtención recombinante de polipéptidos o fragmentos de los mismos funcionales, con actividad biológica, cultivándose un microorganismo que produce polipéptidos, induciéndose, en caso dado, la expresión de los polipéptidos, y aislándose los mismos del cultivo. Los polipéptidos se pueden producir también a escala industrial, si se desea.

El microorganismo recombinante se puede cultivar y fermentar según procedimientos conocidos. Se pueden propagar bacterias, a modo de ejemplo, en medio TB o LB, y a una temperatura de 20 a 40°C, y a un valor de pH de

6 a 9. En particular se describen condiciones de cultivo apropiadas, a modo de ejemplo, en T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989).

5 Las células se disgregan entonces, si los polipéptidos no se secretaron en el medio de cultivo, y el producto se obtiene a partir del producto de lisis según procedimientos de aislamiento de proteínas conocido. Las células se pueden disgregar opcionalmente mediante ultrasonido de frecuencia elevada, a través de presión elevada, como por ejemplo en una célula de presión francesa, mediante osmólisis, mediante acción de detergentes, enzimas o disolventes orgánicos, mediante homogeneizadores, o mediante combinación de varios de los procedimientos indicados.

10 Una purificación de polipéptidos se puede conseguir con procedimientos cromatográficos conocidos, como cromatografía en tamiz molecular (filtración en gel), como cromatografía en Q-Sepharose, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía hidrófoba, así como con otros procedimientos habituales, como ultrafiltración, cristalización, precipitación por sales, diálisis y electroforesis en gel nativa. Se describen procedimientos apropiados, a modo de ejemplo, en Cooper, F. G., *Biochemische Arbeitsmethoden*, editorial Walter de Gruyter, Berlin, New York, o en Scopes, R., *Protein Purification*, editorial Springer, New York, Heidelberg, Berlin.

15 Puede ser ventajoso emplear para aislamiento de la proteína recombinante sistemas de vectores u oligonucleótidos que prolongan el cADN en determinadas secuencias de nucleótidos, y codifican de este modo polipéptidos o proteínas en fusión, que sirven, por ejemplo, para una purificación más sencilla. Tales métodos apropiados son, a modo de ejemplo, los denominados "Tags" que actúan como ancla, como por ejemplo la modificación conocida como ancla de hexa-histidina, o epítomos que se pueden identificar 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 adherir las proteínas a un soporte sólido, como por ejemplo una matriz de polímero, que puede estar cargada, a modo de ejemplo, en una columna de cromatografía, o en una placa de microtitración, o en otro soporte.

25 Estas anclas se pueden emplear simultáneamente también para la identificación de proteínas. Para la identificación de proteína se pueden emplear además marcadores habituales, como colorantes fluorescentes, marcadores enzimáticos, que forman un producto de reacción detectable tras reacción con un sustrato, por separado o en combinación con las anclas, para la derivatización de proteínas.

Otros acondicionamientos para la puesta en práctica del procedimiento de reducción enzimático según la invención

30 Las deshidrogenasas se pueden emplear en el procedimiento según la invención como enzima libre o inmovilizada, o como catalizador contenido aún en el organismo de producción recombinante.

El procedimiento según la invención se lleva a cabo ventajosamente a una temperatura entre 0°C y 95°C, preferentemente entre 10°C y 85°C, de modo especialmente preferente entre 15°C y 75°C.

35 El valor de pH en el procedimiento según la invención se mantiene ventajosamente entre pH 4 y 12, preferentemente entre pH 4,5 y 9, de modo especialmente preferente entre pH 5 y 8.

En el procedimiento según la invención se debe entender por productos enantiómeros puros, o bien quirales, enantiómeros que muestran un enriquecimiento enantiomérico. En el procedimiento se alcanzan preferentemente purzas enantioméricas de al menos un 70 % ee, preferentemente al menos un 80 % ee, de modo especialmente preferente al menos un 90 % ee, de modo muy especialmente preferente al menos un 98 % ee.

40 Para el procedimiento según la invención se pueden emplear células en crecimiento, que contienen ácidos nucleicos, estructuras de ácido nucleico o vectores. También se pueden emplear células en reposo o disgregadas. Se debe entender por células disgregadas, a modo de ejemplo, células que se han hecho permeables a través de un tratamiento, a modo de ejemplo, con disolventes, o células que se han eclosionado a través de un procedimiento mecánico (por ejemplo prensa francesa o ultrasonido), o a través de otro método. Los extractos crudos obtenidos de este modo son apropiados ventajosamente para el procedimiento. Del mismo modo son apropiados microorganismos inmovilizados o enzimas, que se emplean ventajosamente en la reacción.

45 El procedimiento según la invención se puede realizar de manera discontinua, semi-continua o continua.

La puesta en práctica del procedimiento se puede efectuar ventajosamente en bio-reactores, como por ejemplo los descritos en *Biotechnology*, tomo 3, 2ª edición, Rehm et al ed., (1993) en especial capítulo II.

50 Los siguientes ejemplos ilustrarán la invención.

## Parte experimental

**Ejemplo comparativo 1: clonación de alcohol-dehidrogenasa EbN2 de Azoarcus sp. EbN1.**

5 La secuencia del gen de dehidrogenasa EbN2 de Azoarcus sp. EbN1 está depositada en bancos de datos (Seq ID 1 [banco génico ID 56475432, region: 2797788..2798528]). De la secuencia de ácido nucleico del gen se derivaron oligonucleótidos, con los que se amplificó el gen de ADN genómico de Azoarcus sp. EbN1 según procedimientos conocidos. La secuencia obtenida corresponde a la secuencia publicada. La secuencia de ADN de oligonucleótidos se reúne en la tabla 1.

## Condiciones de PCR:

	2 µL	tampón 10*Pfu Ultra (Stratagene)
10	100 ng	cebador#1 (véase tabla 1)
	100 ng	cebador#2 (véase tabla 1)
	1 µL	dNTP (10 mM en cada caso)
	aprox. 30ng	ADN cromosómico de Azoarcus sp. EbN1
	1 U	Pfu-Ultra ADN polimerasa
15	hasta 20 µl	H <sub>2</sub> O

## Programa de temperatura:

	5 min, 94°C,	
	60 seg, 50°C,	
	2 min, 72°C,	} (35 ciclos)
20	60 seg, 94°C,	
	10 min, 72°C,	
	∞, 10°C.	

25 El producto de PCR (aprox. 751 bp) se digirió con las endonucleasas de restricción NdeI y BamHI, y se clonó en el vector pDEH19.2, correspondientemente digerido (DE19848129). Las cargas de ligazón se transformaron en E. coli XL1 Blue (Stratagene).

El plásmido pDHE-PDH-L obtenido se transformó en la cepa E. coli TG10pAgro4 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).

E. coli recombinantes se clasifican con LU 13151.

**30 Ejemplo comparativo 2: clonación de alcohol-dehidrogenasa ChnA de Azoarcus sp. EbN1.**

35 La secuencia del gen de dehidrogenasa ChnA de Azoarcus sp. EbN1 está depositada en bancos de datos (Seq ID 1 [banco génico ID 56475432, region: (complementaria) 192247..192993]). De la secuencia de ácido nucleico del gen se derivaron oligonucleótidos, con los que se amplificó el gen de ADN genómico de Azoarcus sp. EbN1 según procedimientos conocidos. La secuencia obtenida corresponde a la secuencia publicada. La secuencia de ADN de oligonucleótidos se reúne en la tabla 2.

## Condiciones de PCR:

	2 µL	tampón 10*Pfu Ultra (Stratagene)
	100 ng	cebador#3 (véase tabla 2)
	100 ng	cebador#4 (véase tabla 2)
40	1 µL	dNTP (10 mM en cada caso)
	aprox. 30ng	ADN cromosómico de Azoarcus sp. EbN1
	1 U	Pfu-Ultra ADN polimerasa
	hasta 20 µl	H <sub>2</sub> O

Programa de temperatura:

- 5 min, 94°C,  
60 seg, 50°C,  
2 min, 72°C,                      } (35 ciclos)  
5                                      60 seg, 94°C,  
10 min, 72°C,  
∞, 10°C.

10 El producto de PCR (aprox. 743 bp) se digirió con las endonucleasas de restricción NdeI y Bg/II, y se clonó en un vector pDEH19.2 restringido con NdeI y BamHI (DE19848129). Las cargas de ligazón se transformaron en *E. coli* XL1 Blue (Stratagene).

El plásmido pDHE-PDH-L obtenido se transformó en la cepa *E. coli* TG10pAgro4 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).

*E. coli* recombinantes se clasifican con LU 13283.

15 **Ejemplo comparativo 3: puesta a disposición de dehidrogenasas "anti-Prelog" recombinantes**

Se cultivaron LU 13151 o LU 13283 en 20 mL de LB-Amp/Spec/Cm (100 µg/l de ampicilina; 100 µg/l de espectinomomicina; 20 µg/l de cloranfenicol), 0,1 mM IPTG, 0,5 g/L de ramnosa en matraz erlenmeyer de 100 mL (deflectores) 18 h a 37°C, se centrifugó a 5000\*g/10 min, se lavó una vez con 10 mM tris\*HCl, pH 7,0, y se resuspendió en 2 mL del mismo tampón.

20 Se obtuvo extracto crudo proteico disgregándose pasta celular de LU 13151, o bien LU 13283, 0,7 ml de bolas de vidrio (d = 0,5 mm) en un molino de oscilación (3 x 5 min con refrigeración intermedia en hielo).

**Ejemplo comparativo 4: determinación de actividad de dehidrogenasas "anti-Prelog" de *Azoarcus sp.* EbN1**

25 Cada 6 TRANSFORMANTEN se cultivaron en 20 mL de LB Amp/Spec/Cm (100 µg/l Amp; 100 mg/l Spec; 20 µg/l Cm) 0,1 mM IPTG 0,5 g/L ramnosa en matraz erlenmeyer de 100 mL (deflectores) 18 h a 37°C, se centrifugó a 5000\*g/10 min, se lavó una vez con 10mM Tris/HCl pH 7,0, y se resuspendió en 2 mL del mismo tampón.

30 Se obtuvo extracto celular crudo de *E. coli* recombinante, que contenía los genes de dehidrogenasa, mediante disgregación celular con bolas de vidrio de 0,7 ml (d = 0,5 mm) en un molino de oscilación (3 x 5 min con refrigeración intermedia en hielo). En el fotómetro se puede seguir a 340 nm el consumo de co-substratos reducidos durante la reducción de cetonas. En 1 mL 50 mM KPi, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,5, se incubaron a 30°C 10 µL de extracto crudo diluido exento de células (≅ 10 µg de proteína), 10 µmol de cetona y 250 nmol de NADH o NADPH. 1 unidad (1 U) corresponde a la cantidad de enzima que reduce 1 µmol de cetona en 1 min.

**Ejemplo comparativo 5: analítica de feniletanol**

La concentración de acetofenona y feniletanol se pueden determinar por medio de HPLC. Según elección de fase estacionaria y móvil, además de la concentración, también se puede determinar valor ee.

- 35 Fase estacionaria: Hydrodex β-6-TMDM (Macherey & Nagel), longitud: 25 mm, Ø: 250 µm  
Fase móvil: helio, gravilla 100 : 1, flujo total: 92 mL/min, presión: 17 psi  
Velocidad de flujo: 1,0 ml/min  
Detección: FID  
Gradiente de temperatura t = 0 min: 90°C, calentamiento con 3º/min a 140°C  
40 Temperatura de detector 250°C  
Tiempos de retención: acetofenona: aprox. 7,5 min  
(1S)-feniletanol: aprox. 12,5 min  
(1R)-feniletanol: aprox. 12,1 min

45 Se elaboró una serie de calibrado con material auténtico, por medio del cual se puede determinar la concentración de muestras desconocidas.

**Ejemplo 6: puesta a disposición de glucosa-dehidrogenasa para la regeneración de co-factor y regeneración de co-factor con glucosa-dehidrogenasa (copulado enzimático)**

5 Para la regeneración de co-factor se puede emplear glucosa-dehidrogenasa. El enzima es accesible a partir de fuentes comerciales (por ejemplo Jülich Fine Chemicals Order-Nº 22.10 o 19.10) o propias. En el caso de las últimas se trata de un clon de E. coli XL 10 Gold del gen de glucosa-dehidrogenasa en el plásmido pUC19 de Bacillus subtilis (banco génico-nº M12276) (esta estructura tiene la denominación E. coli LU11293).

Para la fermentación de E. coli LU11293 se elaboró el siguiente medio:

560 g	Extracto de levadura (65 %)
448 g	Trypton (Difco)
42 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
84 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
644 g	Glicerina (99 %)
100 mL	Disolución SL4 (5 veces)
1 g	Tegosipon 3062
	Se completa medio con agua a 13,5 L, se ajusta valor de pH a 7,0, se extrae aproximadamente 300 mL para cultivo previo, después se esteriliza 30 min. a 122°C.
	Se añade disolución salina estéril* (se extrae previamente la disolución salina para los matraces vibratorios, véase Rapport).
	* Disolución salina: 2,1 g de CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O 3,5 g de MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O 14 g de NH <sub>4</sub> Cl, se disuelven 14 mL de disolución de ampicilina (100 mg/mL) en 500 mL de agua, y se filtra en medio estéril

10 Se esterilizan respectivamente 150 mL de medio en dos matraces Erlenmeyer de 1 L, y se completan con 5 ml de disolución salina estéril. Tras inoculado de una placa de LB-ampicilina-agar se incubaron los cultivos previos 12 horas a 37°C y 200 rpm, y se añadieron al medio de fermentación. La fermentación se inició a 37°C, 0,1 bar de presión interna, pH 7,0 (regulación con 20 % de ácido fosfórico y 25 % de NaOH) con una velocidad de gasificación de 7,5 L/min y 300 rpm (regulación de pO<sub>2</sub> entre un 20 y un 50 % con 10-20 U/min de aire de alimentación y 500-1500 rpm). Tras 2 horas se añadieron para la inducción 0,1 mM de IPTG, y después de un total de 13 h se concluyó la fermentación. Tras cosecha y lavado de las células (1,3 kg) se almacenaron las mismas hasta empleo (2-20 g/L en la carga) a -20°C.

15 Se disolvieron en tampón y se incubaron a 10-60°C cantidades equimolares de glucosa y cetona con 1-30 U/mL de extracto crudo de glucosa-dehidrogenasa y 1-30 U/mL de extracto crudo de alcohol-dehidrogenasa, 0,02-1 mmol/L de NAD, o bien NADP, o NADH, o bien NADPH. El valor de pH se mantuvo constante mediante adición automática de base.

**Ejemplo comparativo 7: regeneración de co-factor con copulado de sustrato**

25 La regeneración de co-factor se puede llevar a cabo también mediante ambas alcohol-dehidrogenasas en sí mismas. En este caso no es necesaria la adición de un enzima de regeneración aislado. Las alcohol-dehidrogenasas ChnA y Ebn2 aceptan diversos alcoholes sencillos como agente reductor. Se oxidan para dar los correspondientes compuestos carbonílicos. Alcoholes sencillos que son apropiados para la regeneración de NADH o NADPH son isopropanol, butan-2-ol y pentan-2-ol.

**Ejemplo comparativo 8: regeneración de co-factor con formiato-dehidrogenasa (copulado enzimático)**

30 Para la regeneración de co-factor se puede emplear formiato-dehidrogenasa. El enzima es accesible a partir de fuentes comerciales (por ejemplo Jülich Fine Chemicals Order-Nº 09.11, 24.11 o 25.10) o propias. Por consiguiente, análogamente al ejemplo 6 se puede efectuar la regeneración de co-factores también con formiato-dehidrogenasa. En este caso se disuelven en tampón y se incuban a 10-60°C cantidades equimolares de formiato y cetona con 1-30 U/mL de extracto crudo de formiato-dehidrogenasa y 1-30 U/mL de extracto crudo de alcohol-dehidrogenasa, 0,02-1 mmol/L de NAD, o bien NADP, o NADH, o bien NADPH. El valor de pH se mantuvo constante mediante adición automática de ácido.

**Ejemplo 9: obtención de R-feniletanol con dehidrogenasas anti-Prelog recombinantes**

35 Se cultivaron, cosecharon y disgregaron E. coli LU 13151 y comparativamente LU 13283 correspondientemente al ejemplo 3.

## ES 2 377 907 T3

5 Por litro de volumen de reacción se disuelven y se incuban a 30°C 0,2 mmol de NAD, 500 U de glucosa-dehidrogenasa, 1 mol de D-glucosa, 1 mol de acetofenona, 100-1000 U de alcohol-dehidrogenasa de LU 13283 o LU 13151 en tampón KPi (50 mM  $KP_i$ , 1mM  $MgCl_2$ , pH 6,5). El valor de pH se mantuvo constante mediante adición automática de NaOH 2M. Es absolutamente plausible que se puedan alcanzar concentraciones finales de R-feniletanol más elevadas si se dosifica adicionalmente acetofenona en el transcurso de la reacción (régimen fed-batch).

Del mismo modo es posible una reacción en presencia de disolventes orgánicos no hidrosolubles.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BASF SE y Max-Planck-Gesellschaft y universidad de Friburgo  
 <120> procedimiento para la obtención de alcoholes con actividad óptica  
 <130> PF 0000059328

5 <160> 8  
 <170> PatentIn Version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 741  
 <212> ADN

10 <213> Azoarcus sp. EbN1  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(741)  
 <223>

15 <400> 1

```

atg aat cag aaa gtc gca ctc gtc acc ggc gcc atg ggt ggc ctg ggt      48
Met Asn Gln Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Met Gly Gly Leu Gly
1          5          10          15

acc gct atc tgc cag gcg ctg gca aag gac gga atg aag gtc gtg gcc      96
Thr Ala Ile Cys Gln Ala Leu Ala Lys Asp Gly Met Lys Val Val Ala
          20          25          30

aat tgt ctc ccc ggc ttt ccg cag aag gat gag tgg ctg gga cgg cag      144
Asn Cys Leu Pro Gly Phe Pro Gln Lys Asp Glu Trp Leu Gly Arg Gln
          35          40          45

aag gag ctc ggc ttc gat ttc atc gct gcc gaa ggc gac gta tcg gac      192
Lys Glu Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ala Glu Gly Asp Val Ser Asp
          50          55          60

tat gac tcc tgt cgc gcg atg gtg gcg aag atc gag ggc gag gtg ggt      240
Tyr Asp Ser Cys Arg Ala Met Val Ala Lys Ile Glu Gly Glu Val Gly
65          70          75          80

gcg atc gat gtg ctg gtg aac aac gcc ggg atc acc cgc gac aag ttc      288
Ala Ile Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Lys Phe
          85          90          95

ttc ccg aag atg gaa aag gtg cag tgg gat gcg gtc atc aac acc aac      336
Phe Pro Lys Met Glu Lys Val Gln Trp Asp Ala Val Ile Asn Thr Asn
          100          105          110

ctc aac agc ctt ttc aac gtc act cac cac gtt tcg ccg aag atg gca      384
Leu Asn Ser Leu Phe Asn Val Thr His His Val Ser Pro Lys Met Ala
          115          120          125

gaa cgg ggc tat ggc cga atc atc aat att tct tcg gtg aac ggc gtc      432
Glu Arg Gly Tyr Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Val
          130          135          140
    
```

ES 2 377 907 T3

aag ggc cag gcc ggc cag acc aac tac tcg act gcc aag gcg ggc gtg 480  
 Lys Gly Gln Ala Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Val  
 145 150 155 160

ctc ggc ttc acg aaa gcc ctt gcc gcg gaa ctg gcg acg aaa ggc gtg 528  
 Leu Gly Phe Thr Lys Ala Leu Ala Ala Glu Leu Ala Thr Lys Gly Val  
 165 170 175

acc gtc aat gcg atc gcg ccg ggc tat atc gcc acc gag atg gtg atg 576  
 Thr Val Asn Ala Ile Ala Pro Gly Tyr Ile Gly Thr Glu Met Val Met  
 180 185 190

gcg att cgc gaa gac att cgc cag ggc atc atc gac agc gtc ccg atg 624  
 Ala Ile Arg Glu Asp Ile Arg Gln Gly Ile Ile Asp Ser Val Pro Met  
 195 200 205

aag cgc ctg ggc aag ccg gaa gaa atc gcc gct ctg tgc tcc tac ctg 672  
 Lys Arg Leu Gly Lys Pro Glu Glu Ile Gly Ala Leu Cys Ser Tyr Leu  
 210 215 220

tct tcc gat ctg gcc ggt tac gtg acc gcc gcg acg atc aac atc aac 720  
 Ser Ser Asp Leu Ala Gly Tyr Val Thr Gly Ala Thr Ile Asn Ile Asn  
 225 230 235 240

ggc ggc ctc cac atg tgc tga 741  
 Gly Gly Leu His Met Cys  
 245

<210> 2

<211> 246

<212> PTR

5 <213> Azoarcus sp. EbN1

<400> 2

ES 2 377 907 T3

Met Asn Gln Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Met Gly Gly Leu Gly  
1 5 10 15

Thr Ala Ile Cys Gln Ala Leu Ala Lys Asp Gly Met Lys Val Val Ala  
20 25 30

Asn Cys Leu Pro Gly Phe Pro Gln Lys Asp Glu Trp Leu Gly Arg Gln  
35 40 45

Lys Glu Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ala Glu Gly Asp Val Ser Asp  
50 55 60

Tyr Asp Ser Cys Arg Ala Met Val Ala Lys Ile Glu Gly Glu Val Gly  
65 70 75 80

Ala Ile Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Lys Phe  
85 90 95

Phe Pro Lys Met Glu Lys Val Gln Trp Asp Ala Val Ile Asn Thr Asn

ES 2 377 907 T3

	100		105		110												
Leu	Asn	Ser	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	His	His	Val	Ser	Pro	Lys	Met	Ala		
		115					120					125					
Glu	Arg	Gly	Tyr	Gly	Arg	Ile	Ile	Asn	Ile	Ser	Ser	Val	Asn	Gly	Val		
	130					135					140						
Lys	Gly	Gln	Ala	Gly	Gln	Thr	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ala	Lys	Ala	Gly	Val		
145					150					155					160		
Leu	Gly	Phe	Thr	Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Glu	Leu	Ala	Thr	Lys	Gly	Val		
				165					170					175			
Thr	Val	Asn	Ala	Ile	Ala	Pro	Gly	Tyr	Ile	Gly	Thr	Glu	Met	Val	Met		
			180					185					190				
Ala	Ile	Arg	Glu	Asp	Ile	Arg	Gln	Gly	Ile	Ile	Asp	Ser	Val	Pro	Met		
		195					200					205					
Lys	Arg	Leu	Gly	Lys	Pro	Glu	Glu	Ile	Gly	Ala	Leu	Cys	Ser	Tyr	Leu		
	210					215					220						
Ser	Ser	Asp	Leu	Ala	Gly	Tyr	Val	Thr	Gly	Ala	Thr	Ile	Asn	Ile	Asn		
225					230					235					240		
Gly	Gly	Leu	His	Met	Cys												
				245													

<210> 3

<211> 747

<212> ADN

5 <213> Azoarcus sp. EbN1

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(747)

<223>

10 <400> 3

ES 2 377 907 T3

atg	ctg	ctc	gaa	ggg	aaa	acc	gcg	ctg	gtg	acg	ggt	gcc	ggc	aac	ggc	48
Met	Leu	Leu	Glu	Gly	Lys	Thr	Ala	Leu	Val	Thr	Gly	Ala	Gly	Asn	Gly	
1			5					10					15			
atc	ggc	cgc	acc	atc	gcg	ctc	acc	tac	gcc	gcc	gaa	ggg	gcg	aac	gtc	96
Ile	Gly	Arg	Thr	Ile	Ala	Leu	Thr	Tyr	Ala	Ala	Glu	Gly	Ala	Asn	Val	
		20						25					30			
gtc	ggt	tcc	gac	atc	agt	gac	gaa	tgg	ggc	cgg	gaa	aca	ctc	gcc	ctg	144
Val	Val	Ser	Asp	Ile	Ser	Asp	Glu	Trp	Gly	Arg	Glu	Thr	Leu	Ala	Leu	



# ES 2 377 907 T3

<210> 4

<211> 248

<212> PRT

<213> Azoarcus sp. EbN1

5 <400> 4

ES 2 377 907 T3

Met Leu Leu Glu Gly Lys Thr Ala Leu Val Thr Gly Ala Gly Asn Gly  
1 5 10 15

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

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

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

His Pro Glu Asp His Asp Glu Leu Ile Ala Ala Ala Lys Arg Ala Phe  
65 70 75 80

Gly Arg Leu Asp Ile Ala Cys Asn Asn Ala Gly Ile Ser Gly Glu Phe  
85 90 95

Thr Pro Thr Ala Glu Thr Thr Asp Ala Gln Trp Gln Arg Val Ile Gly  
100 105 110

Ile Asn Leu Ser Gly Val Phe Tyr Gly Val Arg Ala Gln Ile Arg Ala  
115 120 125

Met Leu Glu Thr Gly Gly Gly Ala Ile Val Asn Ile Ser Ser Ile Ala  
130 135 140

Gly Gln Ile Gly Ile Glu Gly Ile Thr Pro Tyr Thr Ala Ala Lys His  
145 150 155 160

Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Thr Val Ala Trp Glu Tyr Gly Ser Lys  
165 170 175

Gly Ile Arg Ile Asn Ser Val Gly Pro Ala Phe Ile Asn Thr Thr Leu  
180 185 190

Val Gln Asn Val Pro Leu Glu Thr Arg Arg Gln Leu Glu Gln Met His  
195 200 205

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

Trp Leu Ser Ser Asp Lys Ala Ser Phe Val Thr Gly Ser Tyr Tyr Ala  
225 230 235 240

Val Asp Gly Gly Tyr Leu Ala Arg  
245

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador PCR

<400> 5

gcgattgcat atgaatcaga aagtcgcact 30

10 <210> 6

<211> 32

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador PCR

<400> 6

gcgaggctt cggatcctgc atcagcacat gt 32

<210> 7

<211> 30

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador PCR

<400> 7

25 gcgattgcat atgctgctcg aagggaaaac 30

<210> 8

<211> 30

<212> ADN

<213> secuencia artificial

30 <220>

# ES 2 377 907 T3

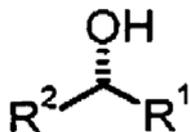
<223> cebador PCR

<400> 8

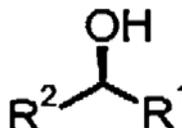
ctgatagatc ttagtgagcg atgaggatca 30

## REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la obtención de alcoholes con actividad óptica de la fórmula Ia o Ib



Fórmula Ia



Fórmula Ib

5 donde

$R^1$ ,  $R^2$  representan grupos alquilo, alqueno, arilo o alquilarilo, que pueden estar substituidos a su vez una o varias veces por alquilo, halógeno, SH,  $SR^2$ , OH,  $OR^2$ ,  $NO_2$ , CN, CO,  $COOR^2$ ,  $NR^2R^3$  o  $NR^2R^3R^+X$ , representando  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$ , independientemente entre sí, H o un resto alquilo inferior o alcoxi inferior con 1 a 6 átomos de carbono, y representando X' un contraión, con la medida de que  $R^1$  sea diferente a  $R^2$ ,

10 mediante reducción de la correspondiente cetona, llevándose a cabo la reducción con una deshidrogenasa con la secuencia de polipéptidos SEQ ID NO: 2, o con una secuencia de polipéptidos, en la que hasta un 25 % de restos aminoácido frente a SEQ ID NO: 2 se han modificado mediante delección, inserción, sustitución, o una combinación de los mismos.

15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la deshidrogenasa se expresa mediante recombinación en un organismo huésped, y la disolución de reacción se incuba con este organismo huésped.

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el organismo huésped se ha exterminado previamente.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la reducción se lleva a cabo a una temperatura de 20-40°C.

20 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el co-factor reducido se regenera a través del propio enzima, o porque como sistema regenerador de co-factor se emplea glucosa-dehidrogenasa, fosfito-dehidrogenasa, formiato-dehidrogenasa, u otra alcohol-dehidrogenasa.