

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 576**

51 Int. Cl.:

C12P 13/24 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 487/02 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 403/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2009 E 09798485 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2307419**

54 Título: **Procesos biocatalíticos para la preparación de compuestos de prolina bicíclica fusionada considerablemente pura estereoméricamente**

30 Prioridad:

24.06.2008 US 75243 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.01.2014

73 Titular/es:

**CODEXIS, INC. (100.0%)
200 Penobscot Drive
Redwood City, CA 94063, US**

72 Inventor/es:

**MIJTS, BENJAMIN;
MULEY, SHEELA;
LIANG, JACK;
NEWMAN, LISA M.;
ZHANG, XIYUN;
LALONDE, JAMES;
CLAY, MICHAEL D.;
ZHU, JUN;
GRUBER, JOHN M.;
COLBECK, JEFFREY;
MUNGER, JOHN D., JR.;
MAVINAHALLI, JAGADEESH y
SHELDON, ROGER**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 438 576 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

Procesos biocatalíticos para la preparación de compuestos de prolina bicíclica fusionada considerablemente para estereoméricamente.

5

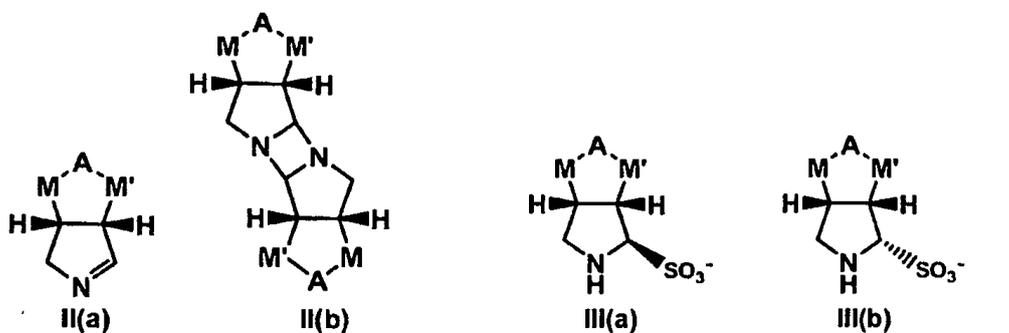
CAMPO TÉCNICO

[0001] Estas especificaciones se relacionan con compuestos de prolina bicíclica fusionada considerablemente para estereoméricamente, de las Fórmulas estructurales II a VII:

10

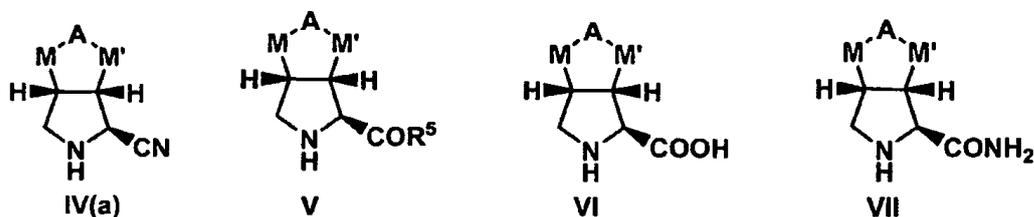
15

20



25

30



en las cuales A, M, M', y R⁵ son como se los describe aquí, con los procesos biocatalíticos para su preparación y con las enzimas biocatalíticas usadas en estos procesos.

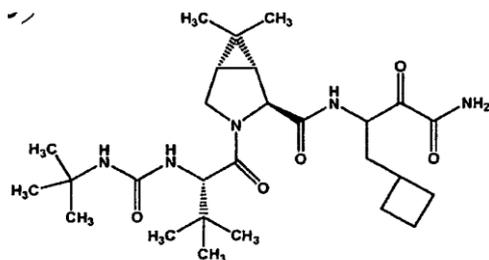
35

ANTECEDENTES

[0002] Los análogos bicíclicos de prolina se usan en el descubrimiento y desarrollo de drogas peptidomiméticas. (A. Trabocchi y otros (2008) Amino Acids (2008) 34: 1—24). Los inhibidores de proteasa del virus de la hepatitis C boceprevir (SCH 505034; ((1R, 2S, 5S)-N-(4-amino-1-ciclobutil-3,4-dioxobutan-2-il)-3((S)-2-(3-tert-butilureido)-3-dimetilbutanoil)-6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2 carboxamida) (Malcolm y otros (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50(3): 1013 20), y telaprevir (VX 950; N-((S)1-ciclohexil-2-((S)- 1-((1S,3aR,6aS)-1-((R)-3-(2-ciclopropilamino)-2 oxoacetil) hexanoil)hexahidrociclopenta[c]pirrol-2(1H)-il)-3,3-dimetil-1-oxobutan-2-ilamino)-2-oxoetil)pirazina-2-carboxamida) (Perni y otros (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50(3):899 909). WO 03/080855, Carr y otros 2003, Angew. Chemie 42:707-710, Carr y otros, 2005, ChemBioChem 6:637-639 y dunsmore y otros, 2006 JACS, 128:2224-2225 describe las monoaminoxidasas para la desracemización de los compuestos que comprenden aminos.

50

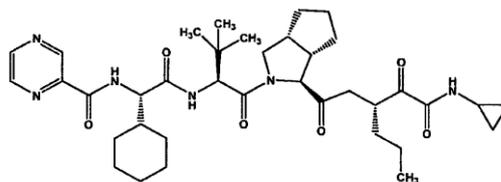
55



60

Boceprevir (SCH-505034)

5



telaprevir (VX-950)

10

[0003] Boceprevir y telaprevir se preparan de ésteres de los análogos bicíclicos cis-fusionados de L-prolina, ácido (1R,2S,5S)-6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0]hexano-2-carboxílico y ácido (1S,3aR,6aS)-octahidrociclopental [c]pirrol-1-carboxílico, respectivamente, los cuales se muestran a continuación:

15



20

[0004] WO 2000/20824 y WO 2000/218369 describen otros numerosos inhibidores de proteasa de la hepatitis C incorporando varios análogos fusionados de L-prolina que corresponden a la fórmula estructural VI. Trabocchi, y otros 2007 Aminoácidos 34: 1-24 es una reseña sobre la preparación de aminoácidos bicíclicos.

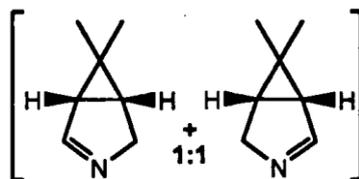
25

[0005] Aunque se han informado métodos de síntesis de moléculas tan complejas usando métodos y herramientas de la química orgánica, estas síntesis generalmente tienen varios pasos, son intrincadas, costosas, ineficientes, procesos de bajo rendimiento general.

30

[0006] Wu y otros (WO 2007/075790) especifica la producción del metil-éster del análogo de prolina bicíclica, ácido (1R,2S,5S)-6,6-dimetil-3-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico, del correspondiente amino bicíclico simétrico (aquiral) de fórmula estructural (1R, 5S)-6,6-dimetil-3-azabicyclo[3.1.0]hexano, empezando con su oxidación a la imina racémica correspondiente, con fórmula estructural

35

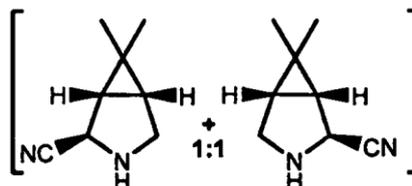


(racemato)

40

[0007] Subsiguientemente se hace reaccionar la imina racémica con cianuro, para otorgar al aminonitrilo racémico la siguiente fórmula estructural

45



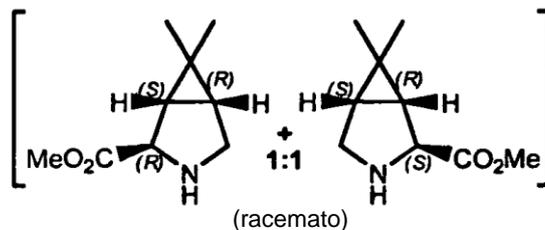
(racemato)

50

55

[0008] el cual entonces es hecho reaccionar con ácido y metanol para dar como resultado el éster metílico del aminoácido racémico de la siguiente fórmula estructural

5



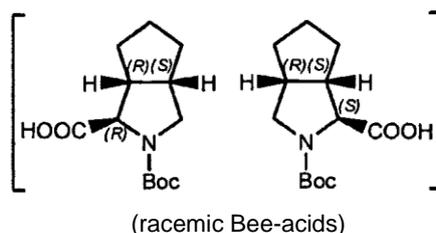
10

[0009] Finalmente, estos ésteres metílicos estereoisoméricos (1R, 2S, 5S) (no deseados) y (1S, 2R, 5R) (deseados) están separados por una resolución de sal diastereomérica, formando ya sea sal ácida di-*p*-toluiloil-D-tartárica con el enantiómero anterior, o sal ácida tartárica di-*p*-toluiloil-L-tartárica con el enantiómero posterior.

15

[0010] Tanoury y otros (WO 2007/022459) especifica la síntesis de ácido racémico (*t*-butoxicarbonil)octahidrociclopenta[*c*]pirrol-1-carboxílico del amino bicíclico simétrico (aquiral) correspondiente haciendo el derivado N-Boc y haciéndolo reaccionar con el agente fosfórico, sec-butlithio en presencia de más que una cantidad estequiométrica de un quelato diamina abultado, luego dióxido de carbono, todos bajo -70°C para producir los aminoácidos racémicos N-Boc descritos a continuación:

20



25

30

[0011] Los estereoisómeros (1R, 2S, 5S) (no deseados) y (1S, 2R, 5R) (deseados) de estos ácidos-Boc racémicos son separados en este momento por una resolución de sal diastereomérica usando bases quirales enantiómeras simples tales como S-1-aminotetralina.

35

[0012] Aunque el estereoisómero deseado del aminoácido derivado se obtiene por estos métodos, la resolución de una mezcla de enantiómeros de estos análogos de prolina bicíclica implica en forma inherente la pérdida de al menos la mitad de todo el material (*por ejemplo*, reactivos, solventes, catalistas, materiales crudos) usados en la mezcla racémica.

40

[0013] También se ha informado que otros métodos para la síntesis química del aminoácido ácido (1S,3aR,6aS)-octahidrociclopenta[*c*]pirrol-1-carboxílico y sus ésteres implican (i) oxidación anódica de N-acetil-3-azabicyclo[3.3.0]octano (EA 00090362), y (ii) un enfoque tiazolioilida (Letters in Drug Design & Discovery (2005) 7: 497-502); J. Org. Chem. 1994, 59, 2773-8). Otro método químico se desarrolla en WO2006/061585.

45

[0014] Los métodos para producir aminoácidos asimétricos de fórmula estructural ácida (1S,3aR,6aS)-octahidrociclopenta[*c*]pirrol-1-carboxílico y los ésteres del mismo de fórmula estructural V de las correspondientes aminas bicíclicas simétricas (aquiral) de fórmula estructural I ((1R, 5S)-6,6-dimetil-3-azabicyclo[3.1.0]hexano) que evitan la formación de mezclas racémicas, y la consiguiente necesidad de separar los enantiómeros, pueden ser más eficientes, con menos residuos, y más rentables que los métodos basados en resolución, descritos más arriba.

50

[0015] Se han usado enzimas monoaminoxidasas para resolver y desracemizar aminas quirales racémicas a través de la oxidación estereoespecífica de un enantiómero a la imina correspondiente, usando oxígeno. Se ha informado que los derivados de la monoaminoxidasa *Aspergillus niger* (MAO N) (Shilling y otros (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* 1243: 529-37) son útiles en combinación con agentes químicos reductores no específicos, para la desracemización de (d/l) α metilbencilamina para proveer una (d) α metilbencilamina enantioméricamente pura (93% ee) (Alexeeva y otros (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 3177-3180). Los derivados de la monoaminoxidasa *Aspergillus niger* flavino dependiente también fueron usados para la desracemización de (R/S)-2-fenipirrolidina para proveer una (R)-2-fenipirrolidina enantioméricamente pura (98% ee) (Carr y otros (2005), *ChemBioChem* 6: 637-39; Gotor y otros "Desimetrización enzimática enantioselectiva en la síntesis orgánica," *Chem. Rev.* (2005) 105: 313-54) Alexandre y otros, 2002. *Tetrahedron Lett* 43: 707-710 detalla la desracemización de los derivados prolil usando una aminoacidoxidasa.

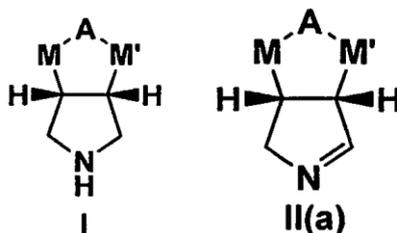
60

65

[0016] Por tanto, se prefiere no sólo proveer compuestos quirales considerablemente puros estereoméricamente, particularmente compuestos quirales aminos que son útiles como intermediarios sintéticos, sino también proveer procesos biocatalíticos eficientes y escalables para su síntesis asimétrica. También es deseable, por tanto, proveer enzimas útiles en esos procesos biocatalíticos.

RESUMEN

[0017] En un primer aspecto, la invención provee una monoaminoxidasa que convierte el compuesto amino de fórmula estructural I a un compuesto imina de fórmula estructural IIa, y que comprende una secuencia aminoácida que es idéntica en al menos 88% a la SEC NRO: 10 y en la cual el aminoácido correspondiente al residuo 465 de SEC NRO: 2 es una glicina, donde los compuestos I y IIa tienen las fórmulas estructurales:



donde A es O, CR^1R^2 , $-C=C-$, $-CH_2-CH_2-$, donde R^1 y R^2 son cada uno seleccionado independientemente de $-H$, $-COOH$, $-X$, $-NH_2$, $-CH_2NHC(NH)NH_2$, $-CX_3$, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, y donde X es seleccionada de F, Cl, y Br;

M y M' pueden estar ambas presentes o pueden estar ambas ausentes, y cuando están las dos, M and M', presentes, M y M' son lo mismo y son seleccionadas de O y CR^3R^4 donde R^3 y R^4 son H, o R^3 o R^4 de M y R^3 o R^4 de M' forman un puente de metileno; con la salvedad que

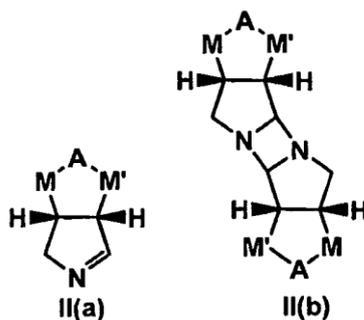
(a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;

(b) A puede $-CH=CH-$ o $-CH_2-CH_2-$ cuando M y M' son CR^3R^4 ; y

(c) cuando M y M' son CR^3R^4 y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta.

[0018] En un segundo aspecto, el invento provee un polinucleótido que codifica la monoaminoxidasa del invento, donde el polinucleótido opcionalmente comprende SEC NRO: 11, 9, 13, 15, 17, 19, o 35.

[0019] En un tercer aspecto, el invento también provee un método para preparar un compuesto considerablemente puro estereoméricamente de acuerdo con la fórmula estructural II:



Incluyendo sales e hidratos del mismo, donde:

A es O, CR^1R^2 , $-C=C-$, o $-CH_2-CH_2-$, donde R^1 y R^2 son cada uno independientemente seleccionados de $-H$, $-COOH$, $-X$, $-NH_2$, $-CH_2NHC(NH)NH_2$, $-CX_3$, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, y donde X se selecciona de F, Cl, y Br;

M y M' pueden estar ambas presentes o ausentes, y cuando están ambas, M y M' presentes, M y M' son lo mismo y son seleccionadas de O y CR^3R^4 donde R^3 y R^4 son H, o R^3 o R^4 de M y R^3 o R^4 de M', forman un puente de metileno;

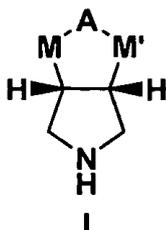
Con las salvedades que

(a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;

(b) A puede ser $-CH=CH-$, o $-CH_2-CH_2-$ cuando M y M' son CR^3R^4 ; y

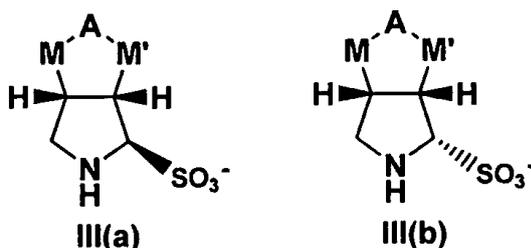
(c) cuando M y M' son CR^3R^4 y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta;

método que comprende contactar un compuesto amina de acuerdo con la fórmula estructural I



donde A, M y M' son como se los define para la fórmula II(a) y (IIb), con oxígeno y la enzima monoaminoxidasa de la invención en presencia de un co-factor, bajo condiciones en las cuales la enzima monoaminoxidasa oxida el compuesto amina de fórmula estructural I al correspondiente compuesto imina de fórmula estructural II(a), siendo el dímero del mismo de fórmula II(b), o una mezcla de los mismos.

[0020] En un cuarto aspecto, el invento provee un método para preparar una mezcla que comprenda un compuesto aminosulfonato considerablemente puro enantioméricamente de acuerdo con la fórmula estructural III(a) y compuesto aminosulfonato considerablemente puro enantioméricamente de acuerdo con la fórmula estructural III (b):



Incluyendo las sales e hidratos de los mismos, donde:

A es O, CR¹R², —C=C-, o —CH₂-CH₂-, donde R¹ y R² son cada uno independientemente seleccionados de -H, -COOH, -X, -NH₂, -CH₂NHC(NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₂CH₃, y donde X es seleccionada de F, Cl, y Br; M y M' pueden estar ambas presentes o ausentes y cuando están ambas, M y M' presentes, M y M' son lo mismo y son seleccionadas de O y CR³R⁴ donde R³ y R⁴ son H, o R³ o R⁴ de M y R³ o R⁴ de M', forman un puente de metileno; Con las salvedades que

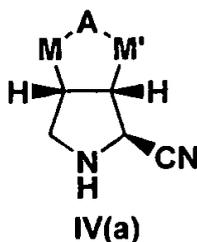
(a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;

(b) A puede ser —CH=CH-, o —CH₂-CH₂- cuando M y M' son CR³R⁴; y

(c) cuando M y M' son CR³R⁴ y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta;

el método que comprende un método del tercer aspecto de la invención y que además comprende la adición de bisulfito bajo condiciones en que rendirá una mezcla que comprenda un compuesto aminosulfato considerablemente puro enantioméricamente de acuerdo con la fórmula estructural III(a) y un compuesto aminosulfato considerablemente puro enantioméricamente de acuerdo con la fórmula III(b), donde el bisulfito es agregado opcionalmente a la reacción antes o simultáneamente con la monoaminoxidasa, o luego de la adición de la monoaminoxidasa.

[0021] En un quinto aspecto, el invento provee un método para preparar un compuesto aminonitrilo considerablemente puro enantioméricamente con fórmula estructural IV(a):



Incluyendo sales e hidratos del mismo, donde:

A es O, CR¹R², —C=C-, o —CH₂-CH₂-, donde R¹ y R² son cada uno independientemente seleccionados de -H, -COOH, -X, -NH₂, -CH₂NHC(NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₂CH₃, y donde X es seleccionada de F, Cl, y Br; M y M' pueden estar ambas presentes o ausentes y cuando están ambas, M y M' presentes, M y M' son lo

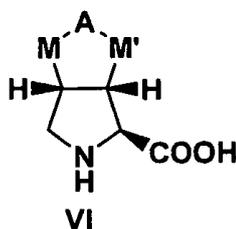
mismo y son seleccionadas de O y CR^3R^4 donde R^3 y R^4 son H, o R^3 o R^4 de M y R^3 o R^4 de M', forman un puente de metileno; con las salvedades que

- 5 (a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;
 (b) A puede ser $-CH=CH-$, o $-CH_2-CH_2-$ cuando M y M' son CR^3R^4 ; y
 (c) cuando M y M' son CR^3R^4 y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta;

10 el método comprende:

- (i) un método del cuarto aspecto del invento y además comprende contactar los compuestos de acuerdo a las fórmulas estructurales III(a) y III(b) con cianuro, bajo condiciones que rendirán el compuesto aminonitrilo sustancialmente puro en su enantiomería de acuerdo a la fórmula estructural IV(a); o
 15 (ii) método del tercer aspecto del invento y además comprende contactar los compuestos de acuerdo a las fórmulas estructurales II(a) o II(b) o la mezcla de las mismas con cianuro bajo condiciones que rendirán el compuesto aminonitrilo sustancialmente puro en su enantiomería de acuerdo a la fórmula estructural IV(a).

20 **[0022]** En un sexto aspecto, el invento provee un método para preparar un compuesto aminoácido considerablemente puro estereoméricamente de acuerdo a la fórmula estructural VI:



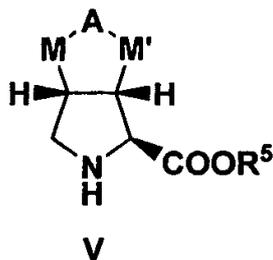
Incluyendo las sales del mismo, donde:

35 A es O, CR^1R^2 , $-C=C-$, o $-CH_2-CH_2-$, donde R^1 y R^2 son cada uno independientemente seleccionados de -H, -COOH, -X, -NH₂, -CH₂NHC(NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₂CH₃, y donde X es seleccionada de F, Cl, y Br; M y M' pueden estar ambas presentes o ambas ausentes y cuando están ambas, M y M' son lo mismo y son seleccionadas de O y CR^3R^4 donde R^3 y R^4 son H, o R^3 o R^4 de M y R^3 o R^4 de M', forman un puente de metileno; con las salvedades que

- 40 (a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;
 (b) A puede ser $-CH=CH-$, o $-CH_2-CH_2-$ cuando M y M' son CR^3R^4 ; y
 (c) cuando M y M' son CR^3R^4 y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta;

45 el método que comprende un método del séptimo aspecto del invento y además comprende contactar el compuesto aminonitrilo de fórmula estructural IV(a) con un ácido y agua bajo condiciones en que el compuesto aminonitrilo se convierta al compuesto aminoácido considerablemente puro estereoméricamente de acuerdo con la fórmula estructural VI.

50 **[0023]** En un séptimo aspecto, la invención provee un método para preparar un compuesto considerablemente puro enantioméricamente de acuerdo con la fórmula estructural V:



Incluyendo las sales del mismo, donde:

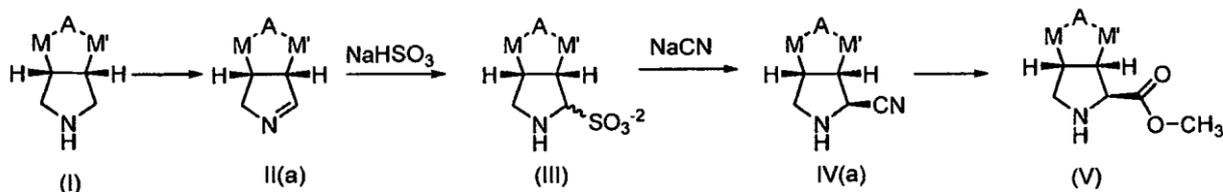
65 R^5 es alquilo(C₁-C₆)

A es O, CR¹R², —C=C—, o —CH₂-CH₂—, donde R¹ y R² son cada uno independientemente seleccionados de -H, -COOH, -X, -NH₂, -CH₂NHC(NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₂CH₃, y donde X es seleccionada de F, Cl, y Br; M y M' pueden estar ambas presentes o ambas ausentes y cuando están ambas, M y M' presentes, M y M' son lo mismo y son seleccionadas de O y CR³R⁴ donde R³ y R⁴ son H, o R³ o R⁴ de M y R³ o R⁴ de M', forman un puente de metileno; con las salvedades que

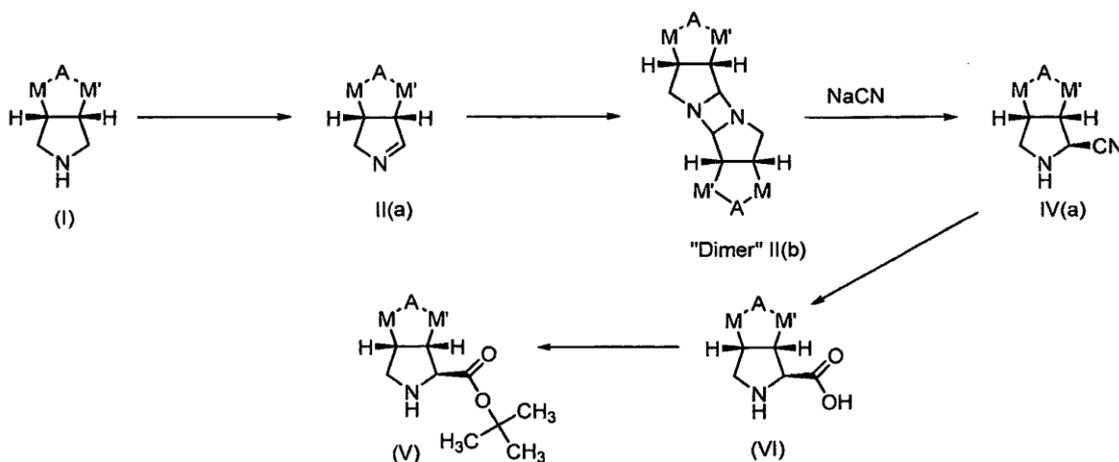
- (a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;
- (b) A puede ser —CH=CH—, o —CH₂-CH₂— cuando M y M' son CR³R⁴; y
- (c) cuando M y M' son CR³R⁴ y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta;

el método comprende:

- i) un método del quinto aspecto del invento y además comprende contactar el compuesto amino nitrilo de fórmula estructural IV(a) con un ácido y un alcohol bajo condiciones en las cuales el compuesto amino nitrilo se convierta al compuesto amino éster considerablemente puro estereoméricamente con fórmula estructural V, y donde el método es opcionalmente



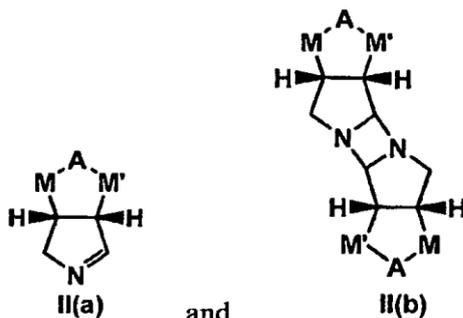
- o
- ii) un método del sexto aspecto del invento además comprende contactar un compuesto aminoácido considerablemente puro estereoméricamente de acuerdo con la fórmula estructural VI con un ácido y un compuesto seleccionado del grupo que comprende R⁵-OH y R⁵OC(O)CH₃ bajo condiciones en las cuales el compuesto aminoácido de acuerdo con la fórmula estructural VI se convierta al compuesto amino éster considerablemente puro estereoméricamente con fórmula estructural V, y donde el método opcionalmente comprende los pasos:



[0024] La presente publicación provee sustancialmente compuestos bicíclicimina de Fórmula II(a) (y dímeros de los mismos de Fórmula estructural II(b)), estereoméricamente puros, que son particularmente útiles como nuevos productos intermedios en la síntesis de agentes terapéuticos estereoméricamente definidos.

5

10



15

20

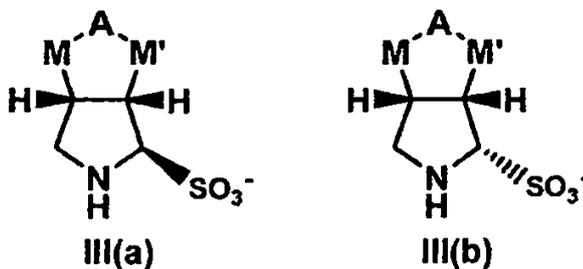
incluyendo sales e hidratos de los mismos, donde A es O, CR^1R^2 , $-C=C$, o $-CH^2-CH^2-$, donde R^1 y R^2 son cada uno seleccionados independientemente de entre-H, $-COOH$, $-X$, $-NH_2$, $-CH_2NI-IC(NH)NH_2$, $-CX_3$, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, y donde X es seleccionado de entre F, Cl y Br. M y M' pueden estar ambos presentes o ausentes y cuando M y M' están presentes, M y M' son iguales y se seleccionan de entre O y CR^3R^4 en donde R^3 y R^4 son H, o R^3 o R^4 de M y R^3 o R^4 de M' de un puente metileno, con la salvedad que : (a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O; (b) A puede ser $-CH=CH-$ o $-CH_2-CH_2-$ cuando M y M' son CR^3R^4 ; y (c) cuando M y M' son CR^3R^4 y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' tienen estereoquímica opuesta.

25

[0025] La presente publicación provee sustancialmente compuestos de amino sulfonato de Fórmula III (a) y de la Formula estructural III(b) enantioméricamente puros, que son particularmente útiles como nuevos productos intermedios en la síntesis de agentes terapéuticos enantioméricamente definidos:

30

35



incluyendo sales e hidratos de los mismos, donde A, M y M' son los descritos anteriormente.

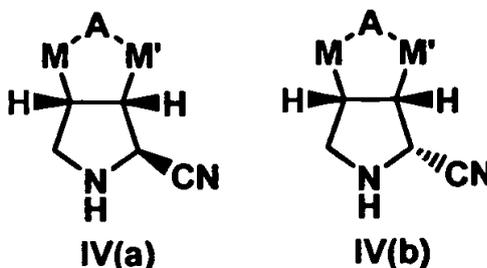
40

45

[0026] Además, La presente publicación provee sustancialmente compuestos de amino nitrilo de Formula estructural IV(a) enantioméricamente puros, que son útiles como nuevos productos intermedios en la síntesis de agentes terapéuticos definidos estereoméricamente. Los compuestos *trans* amino nitrilo de Fórmula IV(a) enantioméricamente puros pueden también proporcionarse como una mezcla que contenga amino nitrilos en *cis* de Formula IV(b) enantioméricamente puros

50

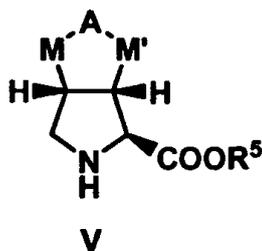
55



incluyendo sales e hidratos de los mismos, donde A, M y M' son los descritos anteriormente.

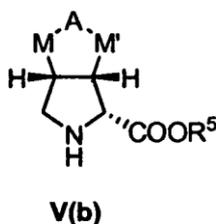
60

[0027] La presente publicación provee sustancialmente compuestos opcionalmente protegidos de Fórmula V enantioméricamente puros, que son particularmente útiles como intermediario en la síntesis de agentes terapéuticos enantioméricamente definidos:



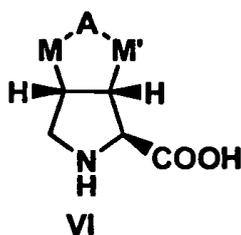
10 incluyendo sales e hidratos de los mismos, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, y donde R⁵ es seleccionado del grupo que consiste en un grupo protector (por ejemplo, bencilo o trimetilsililo y análogos), - (C₁-C₂) alquilo, -(C₁-C₃) alquilo, -(C₁-C₄) alquilo, y -(C₁-C₆) alquilo. En ciertos casos no limitantes R⁵ es metilo, etilo o butilo.

15 **[0028]** La presente publicación provee sustancialmente compuestos opcionalmente protegidos de Fórmula V (b) (correspondiente al enantiómero *cis* del compuesto de Fórmula V) enantioméricamente puros:



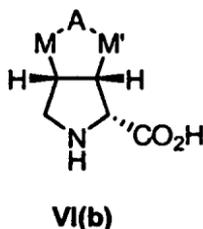
25 incuyendo sales e hidratos de los mismos, donde A, M y M' son los descritos anteriormente, y donde R⁵ es seleccionado del grupo que consiste en un grupo protector (por ejemplo, bencilo o trimetilsililo y análogos), - (C₁-C₂)alquilo- (C₁-C₃)alquilo, - (C₁-C₄)alquilo, y - (C₁-C₆)alquilo. En ciertos casos no limitantes, R⁵ es metilo, etilo u *t*-butilo.

30 **[0029]** La presente publicación provee sustancialmente compuestos sustituidos en el grupo carboxilo de Fórmula VI enantioméricamente puros, que son particularmente útiles como productos intermedios en las síntesis de agentes terapéuticos enantioméricamente definidos:



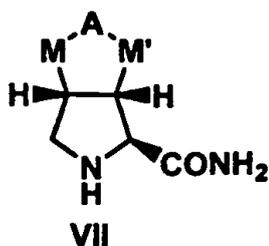
40 incuyendo sales e hidratos de los mismos, donde A, M y M', son los descritos anteriormente.

45 **[0030]** La presente publicación provee sustancialmente compuestos ópticamente protegidos de Fórmula VI (b) (correspondiente al enantiómero *cis* del compuesto de Fórmula VI) enantioméricamente puros:



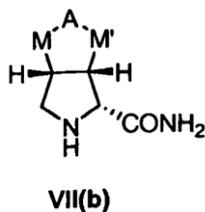
55 incluyendo sales e hidratos de los mismos, donde A, M y M' son los descritos anteriormente.

60 **[0031]** Además, la presente publicación provee sustancialmente compuestos de Fórmula VII enantioméricamente puros, que son particularmente útiles como productos intermedios en la síntesis de agentes terapéuticos enantioméricamente definidos



10 incluyendo sales e hidratos de los mismos, donde A, M y M' son los descritos anteriormente.

[0032] La presente publicación también provee sustancialmente compuestos opcionalmente protegidos de Fórmula VII (b) (correspondiente al enantiómero *cis* del compuesto con Fórmula VII) enantioméricamente puros:



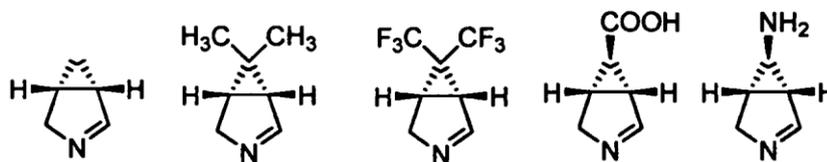
20

25 incluyendo sales e hidratos de los mismos, donde A, M y M' son los descritos anteriormente.

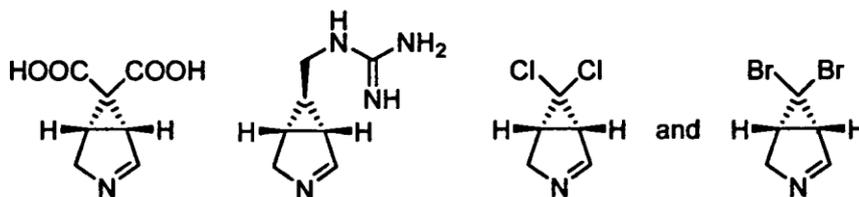
30

[0033] Por lo tanto, en casos particulares, la presente publicación provee los siguientes compuestos de prolina bicíclica fusionada útiles como productos intermedios para la síntesis de uno o más agentes terapéuticos, así como los procesos biocatalíticos para la síntesis de al menos los siguientes compuestos de prolina bicíclica fusionada:

35

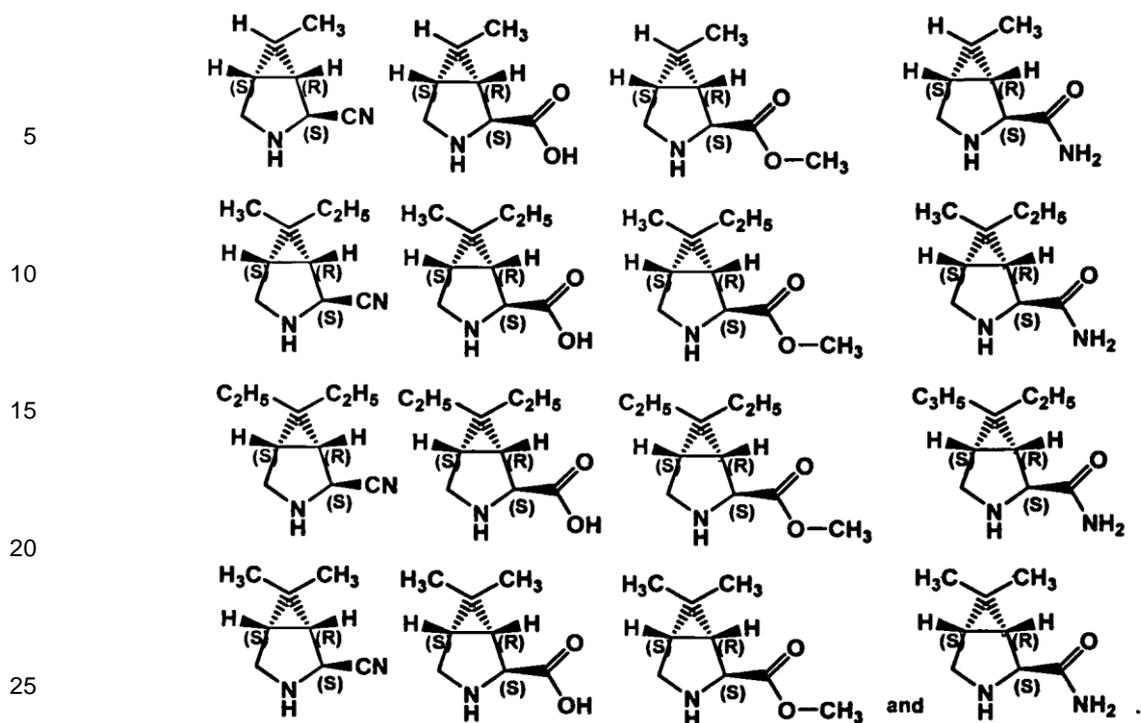


40

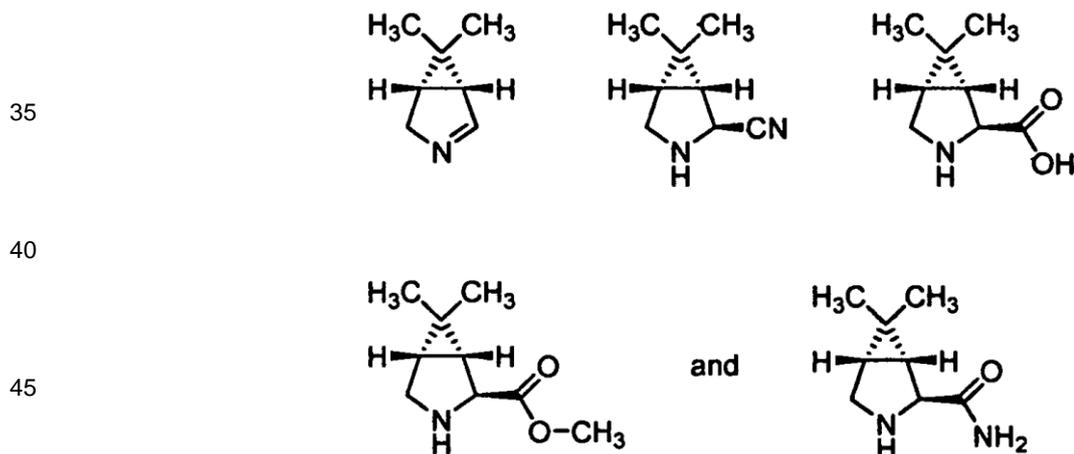


45

[0034] La presente publicación provee los siguientes compuestos de prolina bicíclica fusionada útiles como productos intermedios para la síntesis de uno o más agentes terapéuticos, así como los procesos biocatalíticos para la síntesis de al menos los siguientes compuestos de prolina bicíclica fusionada:



[0035] En otros casos particulares, la presente publicación provee los siguientes compuestos útiles como productos intermedios para la síntesis de uno o más agentes terapéuticos, así como los procesos biocatalíticos para la síntesis de dichos compuestos:



[0036] Por consiguiente, la presente publicación provee compuestos de prolina bicíclica fusionada útiles como productos intermedios para la síntesis de uno o más agentes terapéuticos, así como los procesos biocatalíticos para la síntesis de compuestos de prolina bicíclica fusionada.

[0037] Además, la presente publicación provee sustancialmente métodos para la síntesis biocatalítica de compuestos de Fórmulas estructurales II a VII estereoméricamente puros. En un caso, la presente publicación provee sustancialmente un método para preparar iminas puras estereoméricamente de acuerdo a la Fórmula II, incluyendo sus sales, donde A, M y M' son los descritos anteriormente. El método comprende el contacto de un compuesto de amina simétrica (aquiral) bicíclico de acuerdo con la Fórmula estructural I



en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, con oxígeno y la enzima monoaminoxidasa en presencia de un cofactor en condiciones donde la enzima monoaminoxidasa oxida una amina de Fórmula I a la correspondiente imina de Fórmula II(a), el dímero del mismo de Fórmula II(b) y la mezcla del mismo. En ciertos casos, el cofactor es seccionado del grupo que consiste en FAD, FMN, NADP y NAD. En un caso particular el cofactor es FAD. En algunos casos, la mezcla de reacción incluye además un componente útil para facilitar la desproporción del peróxido de hidrógeno, producto secundario de la reacción enzimática catalizada por la monoaminoxidasa, tal como se describe en el esquema 2 (abajo), a oxígeno molecular y agua. En ciertos casos, ese componente es seleccionado de entre los agentes químicos tales como, pero no limitado a, Pd y Fe y análogos mientras que en otros casos, ese componente es una enzima, como lo es la enzima catalasa. En un caso particular, la mezcla de reacción incluye la enzima catalasa para catalizar la reacción de desproporción descrita en el esquema 2 donde peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se descompone en oxígeno molecular y agua.

[0038] En algunos casos, la monoaminoxidasa capaz de oxidar una amina de Fórmula I a la correspondiente imina de Fórmula II(a) se obtiene de una especie del *Aspergillus*. En casos particulares, la monoaminoxidasa es la monoaminoxidasa de *Aspergillus oryzae*. En cualquiera de los casos, la monoamina puede ser purificada de la especie correspondiente o puede ser aislada como una proteína recombinante expresada en un huésped heterólogo como, aunque no limitado a, *E.coli*.

[0039] En otros casos, la monoaminoxidasa capaz de oxidar una amina de Fórmula I a su correspondiente imina de Fórmula estructural II (a) incluye partes de una o más monoaminoxidasas; por ejemplo, proteínas fusionadas o híbridas que incluyen una porción amino-terminal de la monoamina oxigenasa de *Aspergillus niger* y una porción carboxi-terminal de la monoamina oxigenasa de *Aspergillus oryzae*. En un caso específico, la monoaminoxidasa es una proteína de 495 aminoácidos (SEC NRO: 6) en donde los 314 aminoácidos amino-terminales corresponden a los 314 aminoácidos amino-terminales de *Aspergillus niger* (SEC NRO: 2), y los 181 aminoácidos carboxi-terminal corresponden a los 181 aminoácidos carboxi-terminal de *Aspergillus oryzae* (SEC NRO: 32). En ciertos casos, la monoaminoxidasa es un derivado de la proteína de 495 aminoácidos de la SEC NRO: 6, seleccionada de las SEC NROS: 10, 12, 14, 16, 18, 20, y 36, en donde cada una tiene al menos una sustitución de aminoácido respecto a la secuencia de aminoácidos SEC NRO:6.

[0040] En algunos casos, la monoaminoxidasa capaz de oxidar una amina de Fórmula I a su correspondiente imina de Fórmula estructural II (a) se deriva de la monoaminoxidasa de *Aspergillus* SEC NRO: 2 y tiene dos o más sustituciones de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos de la monoaminoxidasa de *Aspergillus niger* SEC NRO:2. En casos específicos, la monoaminoxidasa capaz de oxidar una amina de Fórmula I a su correspondiente imina de Fórmula estructural II incluye las secuencias de aminoácidos SEC NRO:4 o SEC NRO:8.

[0041] En otro aspecto, la monoaminoxidasa capaz de oxidar una amina de Fórmula I a su correspondiente imina de Fórmula II (a), es una proteína de fusión en donde la secuencia de aminoácidos amino-terminal deriva de la monoaminoxidasa de un *Aspergillus* mientras la secuencia de aminoácidos carboxi-terminal deriva de la monoaminoxidasa de otro *Aspergillus*. En algunos casos no limitantes, tanto las porciones amino-terminal como las carboxi-terminal de tal proteína de fusión pueden ser seleccionadas en forma independiente de entre el grupo que consiste en SEC NRO: 22, 24, 26, 28, 30, 32, y 34. En un caso particular, la porción amino-terminal de la proteína de fusión se deriva de la proteína SEC NRO: 32 mientras que la porción carboxi-terminal de la proteína de fusión se deriva de la proteína SEC NRO: 2.

[0042] En algunos casos, la presente publicación provee un método para preparar compuestos de aminosulfonato de acuerdo con la Fórmula III(a) o III(b), incluyendo las sales e hidratos de los mismos, donde A, M y M' son los descritos anteriormente. Comprenden tratar un compuesto de amina bicíclico simétrico de Fórmula I, donde A, M y M' son de los descritos anteriormente, con oxígeno, una enzima monoaminoxidasa y bisulfito en condiciones que producen el aminosulfonato (el aducto inimo-bisulfito). En un caso particular, la mezcla de reacción de oxidación requiere además la enzima catalasa.

[0043] La presente publicación provee sustancialmente además un método para preparar amino nitrilos de Fórmula IV(a), incluyendo las sales e hidratos de los mismos, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, estereoméricamente puros. El método implica tratar una amina bicíclica simétrica de Fórmula I donde A, M y M' son los descritos anteriormente, con oxígeno, una enzima monoaminoxidasa, y bisulfito, seguido del tratamiento con cianida en condiciones que producen el amino nitrilo. En casos particulares, la mezcla de reacción de oxidación además incluye la enzima catalasa.

[0044] La presente publicación provee sustancialmente además un método para preparar amino nitrilos, de Fórmula IV incluyendo sus sales, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, estereoméricamente puros. El método implica tratar una amina bicíclica simétrica de Fórmula I donde A, M y M' son los descritos anteriormente, con oxígeno y una enzima monoaminoxidasa para formar la imina de Fórmula II (a), un dímero de Fórmula II (b), o sus mezclas, seguido del tratamiento con cianida en condiciones que producen el compuesto amino nitrilo. En casos particulares, la mezcla de reacción de oxidación además incluye la enzima catalasa.

[0045] La presente publicación provee sustancialmente además un método para preparar un amino ácido

estereoméricamente puro, de acuerdo a la Fórmula VI, incluyendo sus sales, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, comenzando de los compuestos de Fórmula II (a) (o los compuestos de Fórmula II(b)) o de aminonitrilos de Fórmula IV (a). El método implica tratar el amino nitrilo de Fórmula IV, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, con ácido y agua en condiciones en donde el amino nitrilo se convierte en el aminoácido de Fórmula VI.

[0046] La presente publicación provee sustancialmente además un método para preparar un amino ácido estereoméricamente puro de acuerdo a Fórmula VI, incluyendo sus sales y co-cristales (por ej., NH₄Cl), en donde A, M y M' son los descritos anteriormente. El método implica tratar una amina (aquiral) simétrica de Fórmula I, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, con oxígeno y una enzima monoaminooxidasa, seguido del tratamiento con cianida en condiciones favorables para generar sustancialmente un amino nitrilo de Fórmula IV estereoméricamente puro. En algunos casos la mezcla de reacción de oxidación además incluye la enzima catalasa. El amino nitrilo formado es tratado con un ácido y agua en condiciones en donde el amino nitrilo se convierte en el aminoácido de Fórmula VI.

[0047] Además, la presente publicación provee sustancialmente un método para preparar un aminoácido estereoméricamente puro de Fórmula VI, incluyendo sus sales y co-cristales (por ej., NH₄Cl), en donde A, M y M' son los descritos anteriormente. El método implica tratar una amina (aquiral) simétrica de Fórmula I, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, con oxígeno, una enzima monoaminooxidasa y bisulfito, seguido del tratamiento con cianida en condiciones favorables para generar un amino nitrilo sustancialmente puro enantioméricamente de Fórmula IV. En algunos casos, la mezcla de reacción de oxidación además incluye la enzima catalasa. El amino nitrilo formado es tratado con un ácido y agua en condiciones en donde el amino nitrilo se convierte en el aminoácido de Fórmula VI. En otros casos, el amino nitrilo formado es tratados con ácido y alcohol en condiciones en donde el amino nitrilo se convierte en el amino éster con Fórmula V.

[0048] Además, la presente publicación provee sustancialmente además un método para preparar un aminoácido puro estereoméricamente de Fórmula V, incluyendo sus sales, donde A, M, M' y R⁵ son los descritos anteriormente, usando nuevos compuestos y métodos, incluyendo los métodos biocatalíticos aquí descritos. El método implica sustancialmente tratar un amino nitrilo puro estereoméricamente de Fórmula IV, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, con ácido y un alcohol en condiciones en donde el amino nitrilo se convierte en éster de amino ácido de Fórmula V.

[0049] Además, la presente publicación provee sustancialmente además un método para preparar un aminoácido puro enantioméricamente de acuerdo a la Fórmula VI, incluyendo sus sales, donde A, M y M' son los descritos anteriormente, usando nuevos compuestos y métodos, incluyendo los métodos biocatalíticos aquí descritos. El método implica tratar un amino nitrilo sustancialmente puro enantioméricamente de Fórmula IV, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, con ácido (por ej., HCl) en condiciones en donde el amino nitrilo se convierte en el aminoácido de Fórmula VI.

[0050] La presente publicación provee además un método para preparar un aminoácido sustancialmente puro enantioméricamente de acuerdo a la Fórmula VI, incluyendo sus sales y co-cristales (por ej., NH₄Cl), en donde A, M y M' son los descritos anteriormente. El método implica tratar una amina de Fórmula I, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, con oxígeno y una enzima monoaminooxidasa y NaHSO₃, seguido del tratamiento con cianida en condiciones favorables para producir amino nitrilo sustancialmente puro enantioméricamente de acuerdo con la Fórmula IV. En algunos casos, la mezcla de reacción incluye además la enzima catalasa. El amino nitrilo formado es tratado con HCl en condiciones en donde el amino nitrilo se convierte en el aminoácido de Fórmula VI.

[0051] Además, la presente publicación provee sustancialmente además un método para preparar éster de aminoácido puro enantioméricamente de acuerdo a Fórmula V, incluyendo sus sales, donde A, M, M' y R⁵ son los descritos anteriormente, usando nuevos compuestos y métodos, incluyendo los métodos biocatalíticos aquí descritos. El método implica tratar un amino nitrilo sustancialmente puro enantioméricamente con Fórmula IV, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, con ácido (por ej., HCl) y un alcohol en condiciones en donde el amino nitrilo se convierte en el éster de aminoácido de Fórmula V.

[0052] La presente publicación provee además sustancialmente un método para preparar una amino amida puro enantioméricamente de acuerdo a la Fórmula VII, incluyendo sus sales, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente. El método implica tratar una amina de acuerdo a la Fórmula I, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente, con oxígeno y una enzima monoaminooxidasa y opcionalmente una enzima catalasa y bisulfito, seguido del tratamiento con cianida en condiciones favorables para producir amino nitrilo sustancialmente puro enantioméricamente de acuerdo con la Fórmula IV, en donde A, M y M' son los descritos anteriormente y posteriormente se trata el amino nitrilo con HCl y agua en condiciones en donde el amino nitrilo se convierte en el aminoácido con Fórmula VII.

[0053] Las monoaminooxididasas de estas especificaciones, que son capaces de oxidar una amina de Fórmula I a la correspondiente imina de Fórmula II, tienen una o más sustituciones de aminoácidos respecto a las secuencias de aminoácidos SEC NRO:2, SEC NRO:32 y SEC NRO:6. Tales sustituciones de aminoácidos proporcionan a la

monoaminooxidasa una o más propiedades mejoradas, incluyendo un aumento en la actividad enzimática, estereoselectividad, termoestabilidad, estabilidad en el disolvente, reducción de la inhibición por producto, reducción de la inhibición por sustrato, o reducción de la sensibilidad para reaccionar con co-productos. Tales sustituciones de aminoácidos pueden también mejorar la solubilidad, la estabilidad, y el nivel de expresión de la monoaminooxidasa en la células huésped, por ej., como una proteína recombinante en un sistema heterólogo como, pero no limitado a células huésped de E.coli.

[0054] Estas especificaciones también proveen polinucleótidos que codifican esas monoaminas oxidasas y métodos para usar los polipéptidos en los procesos biocatalíticos descritos.

[0055] En algunas casos, las monoaminooxidasas descritas en esta especificación, están mejoradas con respecto a las enzimas de SEC NRO:2, SEC NRO:32 o SEC NRO:6 en relación a la tasa de actividad enzimática, a saber, la velocidad de conversión de una amina de Fórmula I a la correspondiente imina de Fórmula II. En algunos casos, las monoaminooxidasas descritas son capaces de convertir el sustrato en producto a una tasa que es 1.5-veces, 2-veces, 3-veces, 4-veces, 5-veces, 10-veces, 25-veces, 50-veces, 100-veces, o más de 100 veces la tasa exhibida por la monoaminooxidasa de SEC NRO:2, SEC NRO:32 o SEC NRO:6. Algunos polipéptidos con tales propiedades incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC NRO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, y 36.

[0056] En algunos casos, las monoaminooxidasas aquí especificadas son capaces de convertir una amina de Fórmula I estructural en la correspondiente imina de Fórmula II estructural con un exceso enantiomérico porcentual de al menos 95%. Los polipéptidos ejemplares con tales propiedades incluyen, pero no se limitan a polipéptidos que abarcan una secuencia aminoácida correspondiente a SEC NRO:4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 36.

[0057] En algunos casos, una monoaminooxidasa mejorada de la publicación se basa en las fórmulas de secuencia de SEC NRO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 y puede abarcar una secuencia aminoácida que es al menos de alrededor del 85%, 86%, 87, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica al mismo. Estas diferencias pueden ser una o más inserciones, supresiones, sustituciones aminoácidas o alguna combinación de tales cambios. En algunos casos, las diferencias en la secuencia aminoácida pueden abarcar sustituciones aminoácidas conservadoras, no conservadoras, así como una combinación de sustituciones conservadoras y no conservadoras. Aquí se describen diversas posiciones de residuos aminoácidos donde se pueden realizar tales cambios.

[0058] En algunos casos, una monoaminooxidasa mejorada de la publicación abarca una secuencia aminoácida en la que el aminoácido correspondiente al residuo 99 de la SEC NRO: 2 y SEC NRO. 6, y al residuo 97 del SEC NRO: 32, glutamina, es sustituida por un aminoácido ácido, es decir, ácido aspártico o ácido glutámico. En un caso particular, ese residuo de glutamina se reemplaza por un residuo de ácido glutámico.

[0059] En algunos casos, una monoaminooxidasa mejorada de la publicación abarca una secuencia aminoácida en la que el aminoácido correspondiente al residuo 365 de la SEC NRO: 2 y SEC NRO. 6, y al residuo 363 del SEC NRO: 32, tirosina, se sustituye de manera conservadora por un aminoácido aromático diferente, es decir, fenilalanina o triptófano. En un caso particular, ese residuo de tirosina se reemplaza por un residuo de triptófano.

[0060] En algunos casos, una monoaminooxidasa mejorada de la publicación abarca una secuencia aminoácida en la que el aminoácido correspondiente al residuo 382 del SEC NRO: 2 y SEC NRO. 6, y al residuo 380 del SEC NRO: 32, fenilalanina, se sustituye por un aminoácido no polar, es decir, valina, isoleucina, alanina, glicina, metionina, o leucina. En un caso particular, ese residuo de fenilalanina se reemplaza por un residuo de leucina.

[0061] En algunos casos, una monoaminooxidasa mejorada de la publicación abarca una secuencia aminoácida en la que el aminoácido correspondiente al residuo 465 del SEC NRO: 2 y SEC NRO. 6, y al residuo 463 del SEC NRO: 32, serina, se sustituye por un aminoácido no polar, es decir, valina, isoleucina, alanina, metionina, leucina o glicina. En un caso particular, ese residuo de serina se reemplaza por un residuo de glicina.

[0062] En otros casos, una monoaminooxidasa mejorada de la publicación abarca una secuencia aminoácida en la que el aminoácido correspondiente al residuo 135 de la SEC NRO: 2 y SEC NRO. 6, treonina, se sustituye de manera conservadora por otro aminoácido polar, es decir, serina, glutamina, o asparraguina. En un caso particular, ese residuo de treonina se reemplaza por un residuo de glutamina.

[0063] En algunos casos, una monoaminooxidasa mejorada de la publicación abarca una secuencia aminoácida en la que el aminoácido correspondiente al residuo 284 del SEC NRO: 2 y SEC NRO. 6, asparraguina, se sustituye por un aminoácido ácido, es decir, ácido aspártico, o ácido glutámico. En un caso particular, ese residuo de asparraguina se reemplaza por un residuo de ácido glutámico.

[0064] En algunos casos, una monoaminooxidasa mejorada de la publicación abarca una secuencia aminoácida en la que el aminoácido correspondiente al residuo 289 de la SEC NRO: 2 se sustituye de manera conservadora por otro aminoácido no polar, es decir, glicina, valina, leucina, isoleucina o metionina. En un caso particular, ese residuo

de alanina se reemplaza por un residuo de valina.

[0065] En otros casos, una monoaminoxidasa mejorada de la publicación abarca una secuencia aminoácida en la que el aminoácido correspondiente al residuo 384 de la SEC NRO: 2, lisina, se sustituye de manera conservadora por otro aminoácido polar, es decir, serina, treonina, o glutamina. En un caso particular, ese residuo de lisina se reemplaza por un residuo de glutamina.

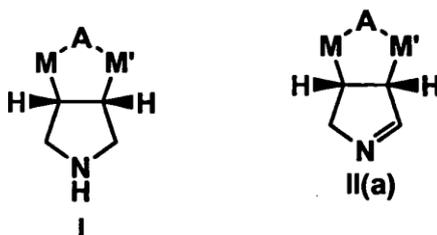
[0066] En algunos casos, una monoaminoxidasa mejorada de la publicación es una monoaminoxidasa que es un homólogo de la monoaminoxidasa de *Aspergillus niger* (SEC NRO: 2) o un homólogo de la monoaminoxidasa de *Aspergillus oryzae* (SEC NRO: 44) y que lleva una o más sustituciones aminoácidas correspondientes a las descritas en este documento. Los homólogos ilustrativos incluyen las monoaminoxidasas de la SEC NRO: 22, SEC NRO: 24, SEC NRO: 26, SEC NRO: 28, SEC NRO: 30, SEC NRO: 32, y SEC NRO: 34. En otros casos, una monoaminoxidasa mejorada de la publicación es una monoaminoxidasa seleccionada de entre las enzimas de SEC NRO: 22, SEC NRO: 24, SEC NRO: 26, SEC NRO: 28, SEC NRO: 30, SEC NRO: 32, y SEC NRO: 34 y que lleva una o más sustituciones aminoácidas correspondientes descritas en este documento.

[0067] En otro aspecto, la presente publicación brinda polinucleótidos que codifican las monoaminoxidasas diseñadas aquí descritas o polinucleótidos que hibridan a dichos polinucleótidos en condiciones altamente rigurosas. El polinucleótido puede incluir promotores y otros elementos reguladores útiles en la expresión de la codificada monoaminoxidasa diseñada, y puede utilizar codones optimizados para los específicos sistemas de expresión deseados. Los polinucleótidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, SEC NRO: 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 31, y 35.

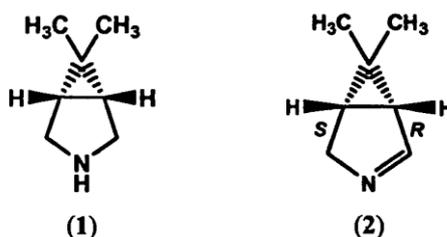
[0068] En otro aspecto, la presente publicación brinda células huésped que abarcan los polinucleótidos y/ o vectores de expresión aquí descriptos. Las células huésped pueden ser células de una especie *Aspergillus*, por ejemplo *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, o *Aspergillus nidulans*, o pueden ser un organismo diferente, por ejemplo, *E. coli* o *S. cerevisiae*. Las células huésped pueden ser utilizadas para la expresión y aislamiento de las enzimas monoaminoxidasas diseñadas aquí descritas, o, alternativamente, pueden ser utilizadas directamente para la conversión del sustrato al producto estereoisomérico.

[0069] Ya sea que se lleve a cabo el método con células completas, extractos de células o monoaminoxidasas purificadas, se puede utilizar una monoaminoxidasa simple o, alternativamente, se pueden utilizar mezclas de dos o más monoaminoxidasas.

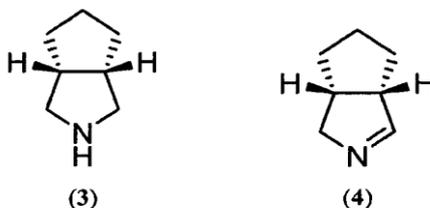
[0070] Las enzimas de las monoaminoxidasas aquí descriptas son capaces de catalizar la oxidación de un compuesto de Fórmula estructural I a un compuesto de Fórmula estructural II (a):



[0071] En un caso particular, las enzimas de monoaminoxidasa aquí descriptas son capaces de catalizar la oxidación de (1R,5S)-6,6-dimetil- 1-3azabicyclo (3.1.0)hex-*no*, compuesto (1) a (1R,5S)-6,6-dimetil- 1-3-azabicyclo (3.1.0)hex-2-*eno*, compuesto (2):



[0072] En otro caso particular, las enzimas de monoaminoxidasa aquí descriptas son capaces de catalizar la oxidación de (3aR,6aS)-octahidrociclopenta(c)pirrol, compuesto (3) a (3aS,6aR)-1,3a,4,5,6,6a-hexahidrociclopenta(pirrol, compuesto (4):



5

10 **[0073]** En algunos casos del método de oxidación de un compuesto de la Fórmula estructural I a un compuesto de la Fórmula estructural II(a), se oxida el sustrato al producto en un grado mayor al 99% de exceso estereomérico, donde la monoaminoxidasa abarca una secuencia que corresponde a las SEC NRO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, o 36.

15 **[0074]** En algunos casos de este método de oxidación de un compuesto de Fórmula estructural I a un compuesto de Fórmula estructural II(a), se convierte al menos alrededor del 10-20% de 1-100g/L de sustrato al producto en menos de 24 horas con cerca de 1-10g/L del polipéptido, donde el polipéptido abarca una secuencia amino ácida correspondiente al SEC NRO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, o 36.

20 **[0075]** En algunos casos de este método de reducción del sustrato del producto, al menos alrededor del 95% del sustrato se convierte al producto en menos de 24 horas cuando se lleva a cabo con más de 25-50g/L de sustrato y menos de 1-5g/L del polipéptido, donde el polipéptido abarca una secuencia amino ácida correspondiente al SEC NRO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, o 36.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

25

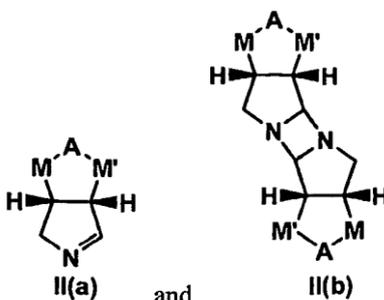
Compuestos Fusionados Bicíclicos de Prolina de la Publicación

Compuestos Fusionados Bicíclicos de Prolina de Fórmula II(a) y (b)

30 **[0076]** La presente publicación provee sustancialmente compuestos fusionados bicíclicos de prolina de Fórmula estructural II(a) enantioméricamente puros y los dímeros del mismo, compuestos de la Fórmula estructural II(b) y mezclas del mismo:

35

40



45

incluso sales e hidratos del mismo, donde A es O, CR¹R², -C=C, o -CH₂-CH₂-, donde R¹ y R² son cada uno seleccionados independientemente desde -H, -COOH, -X, -NH₂, -CH₂NHC(NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₂CH₃, y donde X se selecciona desde F, Cl, y Br. M y M' pueden ambos estar presentes o ambos ausentes y cuando ambos M y M' están presentes M y M' son los mismos y se seleccionan desde O y CR³R⁴ donde R³ y R⁴ son H, o R³ o R⁴ de M y R³ o R⁴ de M' forman un puente de metileno, con las salvedades de que: (a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O; (b) A puede ser -CH=CH- o -CH₂-CH₂- cuando M y M' son CR³R⁴; y (c) cuando M y M' son CR³R⁴ y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta.

50

55

[0077] En otro caso A es -CH₂-.

[0078] En otro caso A es -CH(CH₃)-.

[0079] En otro caso A es -C(CH₃)₂-.

60

[0080] En otro caso A es -CH(CH₂CH₃)-.

[0081] En otro caso A es -C(CH₂CH₃)₂-.

65

[0082] En otro caso A es -C(CH₂CH₃)(CH₃)-.

[0083] En otro caso M y M' están ausentes y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂CH(CH₃)-, -

CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, -C(C₂H₅)₂-, -CF₂-, -CCl₂-, -CBr₂-, -C(CF₃)₂-, -CH(COOH)-, -C(COOH)₂-, -CH(NH₂)-, y -CH(CH₂NHC(NH)NH₂)₂-.

5 **[0084]** En otro caso M y M' están ausentes y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂-, -C(CH₃)₂-, -C(CH₃)₂-, and -C(C₂H₅)₂-.

10 **[0085]** En otro caso, M y M' son -CH₂- y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -O-, -CH₂-, -C(CH₃)₂-, -CH(CH₃)-, -C(C₂H₅)₂-, -CH(C₂H₅)-, -CF₂-, -CCl₂-, -CBr₂-, -C(CF₃)₂-, -CH(COOH)-, -C(COOH)₂-, -CH(NH₂)-, and -C(H₂)NHC(NH)NH₂-.

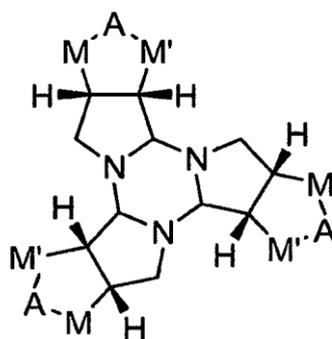
15 **[0086]** En un caso más, M y M' son -O- y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -O-, -CH₂-, and -C(CH₃)₂-.

20 **[0087]** En aún un caso más, M y M' son -O- y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, -C(C₂H₅)₂-, -CF₂-, -CCl₂-, -CBr₂-, -C(CF₃)₂-, -CH(COOH)-, -C(COOH)₂-, -CH(NH₂)-, y -CH(CH₂NHC(NH)NH₂)₂-.

25 **[0088]** En otro caso, M y M' son -O- y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂-, -C(CH₃)₂-, y -C(C₂H₅)₂-.

[0089] Se sabe que muchas iminas de compuestos de pirrolidina (por ejemplo, 3,4-dehidro-2H-pirrol) forman un trímero termodinámicamente favorecido debido a la tensión del anillo además de, o en vez de un dímero.

30 **[0090]** En consecuencia, en algunos casos, cualquiera de los compuestos arriba citados de la Fórmula II(a) también pueden existir en forma de trímero con la Fórmula estructural II(c)

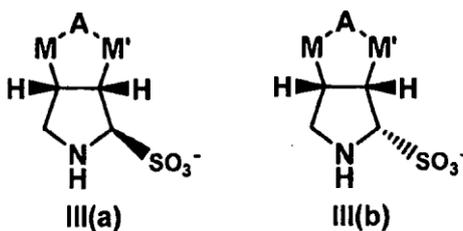


II(c)

35 **[0091]** En algunos casos, la publicación brinda trímeros de compuestos de Fórmula II(a), por ejemplo, compuestos de Fórmula II(c), y mezclas del mismo con compuestos del Fórmula II(a) y/o Fórmula II(b).

40 Sulfonato de Amina de Fórmula estructural III

45 **[0092]** La presente publicación provee más sustancialmente compuestos de sulfonato de amina de Fórmula estructural III(a) y (b) enantioméricamente puros:



III(a)

III(b)

50 incluyendo sales, hidratos y mezclas del mismo, donde A es O, CR'², -C=C-, o -CH₂-CH₂-, donde R¹ y R² son cada uno seleccionados independientemente de -H-, -COOH-, -X-, -NH₂-, -CH₂NHC(NH)NH₂-, CX₃-, -CH₃-, -CH₂CH₃-, y donde X se selecciona desde F, Cl, y Br. M y M' pueden ambos estar presentes o ambos ausentes y cuando ambos M y M' están presentes M y M' son los mismos y se seleccionan desde O y CR³R⁴ donde R³ y R⁴ son H, o R³ o R⁴ of M and R³ o R⁴ of M' forman un puente de metileno, con las salvedades de que: (a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O; (b) A puede -CH=CH- o -CH₂-CH₂- cuando M y M' son CR³R⁴; y (c) cuando M' y M' son CR³R⁴ y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta.

65 **[0093]** En otro caso A es -CH₂-.

[0094] En otro caso A es -CH(CH₃)-.

[0095] En otro caso A es -C(CH₃)₂-.

5 [0096] En otro caso A es -CH(CH₂CH₃)-.

[0097] En otro caso A es -C(CH₂CH₃)₂-.

[0098] En otro caso A es -C(CH₂CH₃)(CH₃)-.

10 [0099] En un caso M y M' están ausentes y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, C(C₂H₅)₂-, -CF₂-, -CCl₂-, -CBr₂-, -C(CF₃)₂-, -CH(COOH)-, -C(COOH)₂-, -CH(NH₂)- y -CH₂NHC(NH)NH₂-.

15 [0100] En otro caso M y M' están ausentes y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂-, -C(CH₃)₂-, -C(CH₃)₂-, and -C(C₂H₅)₂-.

[0101] En otro caso, M y M' son -CH₂- y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -O-, -CH₂-, -C(CH₃)₂-, -CH(CH₃)-, -C(C₂H₅)₂-, -CH(C₂H₅)-, -CF₂-, -CCl₂-, -CBr₂-, -C(CF₃)₂-, -CH(COOH)-, -C(COOH)₂-, -CH(NH₂)-, y -C(H₂)NHC(NH)NH₂-.

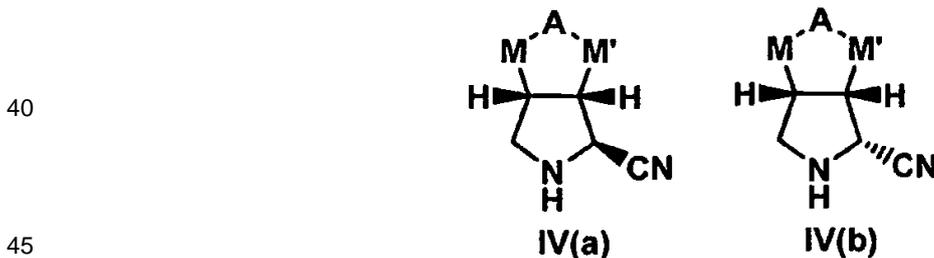
20 [0102] En un caso más, M y M' son -O- y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -O-, -CH₂-, and -C(CH₃)₂-.

25 [0103] En aún un caso más, M y M' son -O- y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, -C(C₂H₅)₂-, -CF₂-, -CCl₂-, -CBr₂-, -C(CF₃)₂-, -CH(COOH)-, -C(COOH)₂-, -CH(NH₂)-, y -CH(CH₂NHC(NH)NH₂)-.

30 [0104] En otro caso, M y M' son -O- y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂-, -C(CH₃)₂-, y -C(C₂H₅)₂-.

Compuestos de Amino nitrilo de Fórmula estructural IV

35 [0105] Además, la presente publicación provee sustancialmente compuestos de amino nitrilo de la Fórmula estructural IV(a) y (b) enantioméricamente puros:



Incluso sales, hidratos y mezclas del mismo, donde A es O, CR¹R², -C=C-, o -CH₂-CH₂-, donde R¹ y R² son cada uno seleccionados independientemente de -H-, -COOH-, -X-, -NH₂-, -CH₂NHC(NH)NH₂-, -CX₃-, -CH₃-, -CH₂CH₃-, y donde X se selecciona desde F, Cl, y Br. M y M' pueden ambos estar presentes o ambos ausentes y cuando ambos M y M' están presentes M y M' son los mismos y se seleccionan desde O y CR³R⁴ donde R³ y R⁴ son H, o R³ o R⁴ de M y R³ o R⁴ of M' forman un puente de metileno, con las salvedades de que: (a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O; (b) A puede ser -CH=CH- o -CH₂-CH₂- cuando M y M' son are CR³R⁴; y (c) cuando M y M' son CR³R⁴ y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta.

55 [0106] En un caso, A es -CH₂-.

[0107] En otro caso A es -CH(CH₃)-.

60 [0108] En otro caso A es -C(CH₃)₂-.

[0109] En otro caso A es -CH(CH₂CH₃)-.

[0110] En otro caso A es -C(CH₂CH₃)₂-.

65 [0111] En otro caso A es -C(CH₂CH₃)(CH₃)-.

[0112] En otro caso M y M' están ausentes y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, -C(C₂H₅)₂-, -CF₂-, -CCl₂-, -CBr₂-, -C(CF₃)₂-, -CH(COOH)-, -C(COOH)₂-, -CH(NH₂)-, y -CH(CH₂NHC(NH)NH₂)-.
5

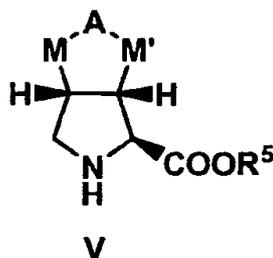
[0113] En otro caso M y M' están ausentes y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂-, -C(CH₃)₂-, -C(CH₃)₂-, and -C(C₂H₅)₂-.
10

[0114] En otro caso, M y M' son -CH₂- y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -O-, -CH₂-, -C(CH₃)₂-, -CH(CH₃)-, -C(C₂H₅)₂-, -CH(C₂H₅)-, -CF₂-, -CCl₂-, -CBr₂-, -C(CF₃)₂-, -CH(COOH)-, -C(COOH)₂-, -CH(NH₂)-, y -C(H₂)NHC(NH)NH₂-.
15

[0115] En un caso más, M y M' son -O- y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -O-, -CH₂-, and -C(CH₃)₂-.
20

Compuestos de Prolina Bicíclicos Fusionados de Fórmula estructural V

[0116] La presente publicación provee compuestos de prolina bicíclicos fusionados de Fórmula estructural V:
25



incluyendo sales e hidratos del mismo, en los cuales A, M y M', donde R^S es seleccionado del grupo que consiste en un grupo protector (por ejemplo bencilo o trimetilsililo y similares), -(C1-C₂) alquilo, -(C1-C₃) alquilo, -(C1-C₄) alquilo, y -(C1-C₆) alquilo. En algunos casos no limitantes R^S es metilo, etilo, o t-butilo incluso sales e hidratos del mismo, donde A es O, CR¹R², -C=C, o -CH₂-CH₂-, donde R¹ y R² son cada uno seleccionados independientemente desde -H, -COOH, -X, NH₂, -CH₂NHC(NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₁CH₃, y donde X se selecciona desde F, Cl, y Br. M y M' pueden ambos estar presentes o ambos pueden estar ausentes y cuando ambos M y M' están presentes M y M' son los mismos y se seleccionan desde O y CR³R⁴ donde R³ y R⁴ son H, o R³ o R⁴ de M y R³ o R⁴ de M' forman un puente de metileno, con las salvedades de que: (a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O; (b) A puede ser -CH=CH- o -CH₂-CH₂- cuando M y M' son CR³R⁴; y (c) cuando M' y M' son CR³R⁴ y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta.
30

[0117] En un caso, A es -CH₂-.
35

[0118] En otro caso A es -CH(CH₃)-.
40

[0119] En otro caso A es -C(CH₃)₂-.
45

[0120] En otro caso A es -CH(CH₂CH₃)-.
50

[0121] En otro caso A es -C(CH₂CH₃)₂-.
55

[0122] En otro caso A es -C(CH₂CH₃)(CH₃)-.
60

[0123] En un caso M y M' están ausentes y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, -C(C₂H₅)₂-, -CF₂-, -CCl₂-, -CBr₂-, -C(CF₃)₂-, -CH(COOH)-, -C(COOH)₂-, -CH(NH₂)-, and -CH(CH₂NHC(NH)NH₂)-.
65

[0124] En otro caso M y M' están ausentes y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂-, -C(CH₃)₂-, -C(CH₃)₂-, and -C(C₂H₅)₂-.
70

[0125] En otro caso, M y M' son -CH₂- y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -O-, -CH₂-, -C(CH₃)₂-, -CH(CH₃)-, -C(C₂H₅)₂-, -CH(C₂H₅)-, -CF₂-, -CCl₂-, -CBr₂-, -C(CF₃)₂-, -CH(COOH)-, -C(COOH)₂-, -CH(NH₂)-, y -C(H₂)NHC(NH)NH₂-.
75

[0126] En un caso más, M y M' son -CH₂- y A se selecciona de entre el grupo que consiste en -O-, -CH₂-, and -C(CH₃)₂-.
80

[0127] En un caso, R^S es bencilo.
85

[0128] En un caso R^s es trimetilsililo

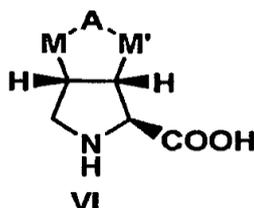
[0129] En otro caso R^s es metilo.

5 [0130] En un caso más R^s es etilo.

[0131] En otro caso R^s es t-butilo.

Compuestos de Prolina Bicíclicos Fusionados de Fórmula estructural VI

10 [0132] La presente publicación también provee sustancialmente compuestos enantioméricamente puros de Fórmula estructural VI:



Incluso sales e hidratos del mismo, donde A es O, CR^1R^2 , $-C=C-$, o $-CH_2-CH_2-$, donde R^1 y R^2 son cada uno seleccionados independientemente de $-H$, $-COOH$, $-X$, $-NH_2$, $-CH_2NHC(NH)NH_2$, $-CX_3$, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, y donde X se selecciona desde F, Cl, y Br. M y M' pueden ambos estar presentes o ambos ausentes y cuando ambos M y M' están presentes M y M' son los mismos y se seleccionan desde O y CR^3R^4 donde R^3 y R^4 son H, o R^3 o R^4 de M y R^3 o R^4 de M' forman un puente de metileno, con las salvedades de que: (a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O; (b) A puede ser $-CH=CH-$ o $-CH_2-CH_2-$ cuando M y M' son CR^3R^4 ; y (c) cuando M' y M' son CR^3R^4 y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta.

30 [0133] En un caso, A es $-CH_2-$.

[0134] En otro caso A es $-CH(CH_3)-$.

35 [0135] En otro caso A es $-C(CH_3)_2-$.

[0136] En otro caso A es $-CH(CH_2CH_3)-$.

[0137] En otro caso A es $-C(CH_2CH_3)_2-$.

40 [0138] En otro caso A es $-C(CH_2CH_3)(CH_3)-$.

[0139] En un caso M y M' están ausentes y A se selecciona de entre el grupo que consiste en $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-CH(C_2H_5)-$, $-C(CH_3)_2-$, $C(C_2H_5)_2-$, $-CF_2-$, $-CCl_2-$, $-CBr_2-$, $-C(CF_3)_2-$, $-CH(COOH)-$, $-C(COOH)_2-$, $-CH(NH_2)-$ y $-C(H_2)NHC(NH)NH_2-$.

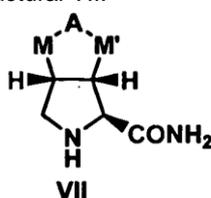
45 [0140] En otro caso M y M' están ausentes y A se selecciona de entre el grupo que consiste en $-CH_2-$, $-C(CH_3)_2-$, $-C(CH_3)_2-$, y $C(C_2H_5)_2-$.

50 [0141] En otro caso, M y M' son $-CH_2-$ y A se selecciona de entre el grupo que consiste en $-O-$, $-CH_2-$, $-C(CH_3)_2-$, $CH(CH_3)-$, $C(C_2H_5)_2-$, $CH(C_2H_5)-$, CF_2- , $-CCl_2-$, $-CBr_2-$, $-C(CF_3)_2-$, $-CH(COOH)-$, $-C(COOH)_2-$, $-CH(NH_2)-$ y $-C(H_2)NHC(NH)NH_2-$.

[0142] En un caso más, M y M' son $-CH_2-$ y A se selecciona de entre el grupo que consiste en $-O-$, $-CH_2-$, $-C(CH_3)_2-$

55 Compuestos de Prolina Bicíclicos Fusionados de Fórmula estructural VII

[0143] Además, esta publicación provee sustancialmente compuestos de iminoácidos heterobíclicos enantioméricamente puros de Fórmula estructural VII:



incluyendo sales e hidratos de los mismos, donde A es O, CR¹R², -C=C-, -CH₂-CH₂-, donde R¹ y R² son cada uno seleccionado independientemente de -H, -COOH, -X, -NH₂, -CH₂NHC(NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₂CH₃, y donde X es seleccionada de F, Cl, y Br. M y M' pueden estar ambas presentes o pueden estar ambas ausentes, y cuando están las dos, M y M', presentes, M y M' son lo mismo y son seleccionadas de O y CR³R⁴ donde R³ y R⁴ son H, o R³ o R⁴ de M y R³ o R⁴ de M' forman un puente de metileno; con la salvedad que: (a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O; (b) A puede ser -CH=CH- o -CH₂-CH₂- cuando M y M' son CR³R⁴; y (c) cuando M y M' son CR³R⁴ y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta.

[0144] En un caso, R⁶ y R⁷ son ambos H.

[0145] En un caso A es -CH₂-.

[0146] En otro caso A es -CH(CH₃)-.

[0147] En otro caso A es -C(CH₃)₂-.

[0148] En otro caso A es -CH(CH₂CH₃)-.

[0149] En otro caso A es -C(CH₂CH₃)₂-.

[0150] En otro caso A es -C(CH₂CH₃)(CH₃)-.

[0151] En un caso M y M' están ausentes y A se selecciona del grupo que incluye -CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, -C(C₂H₅)₂-, -CF₂-, -CCl₂-, -CBr₂-, -C(CF₃)₂-, -CH(COOH)-, -C(COOH)₂-, -CH(NH₂)-, y -CH(CH₂NHC(NH)NH₂)-.

[0152] En otro caso M y M' están ausentes y A se selecciona del grupo que incluye -CH₂-, -C(CH₃)₂-, -C(CH₃)₂- y -C(C₂H₅)₂-.

[0153] En otro caso M y M' son -CH₂- y A se selecciona del grupo que incluye -O-, -CH₂-, -C(CH₃)₂-, -CH(CH₃)-, -C(C₂H₅)₂-, -CH(C₂H₅)-, -CF₂-, -CCl₂-, CBr₂-, -C(CF₃)₂-, -CH(COOH)-, -C(COOH)₂-, -CH(NH₂)-, y -C(H₂)NHC(NH)NH₂-.

[0154] En otro caso M y M' son -CH₂- y A se selecciona del grupo que incluye -O-, -CH₂-, -C(CH₃)₂-.

Monoaminoxidasas de la publicación

[0155] Las monoaminoxidasas de esta publicación, capaces de oxidar una amina de fórmula estructural I produciendo la correspondiente imina de fórmula estructural II, tienen una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEC NRO: 2, SEC NRO:6, y SEC NRO:32. Dichas sustituciones de aminoácido proveen a la monoaminoxidasa de una o más propiedades mejoradas incluyendo un aumento en la actividad enzimática, estereoespecificidad, termoestabilidad, estabilidad solvente, inhibición de producto reducida, inhibición de sustrato reducido, o sensibilidad reducida a subproductos reactivos. Dichas sustituciones de aminoácidos también pueden mejorar el nivel de expresión, la solubilidad, y/o la estabilidad de la monoaminoxidasa en una célula huésped, por ejemplo como una proteína expresada en forma recombinante en una célula huésped heteróloga, tal como pero no limitado a una célula huésped de *E. coli*. En un caso, la sustitución aminoacídica S4656 provee un aumento considerable en el nivel de expresión, solubilidad y/o estabilidad de una aminooxidasa de esta publicación en *E. coli*.

[0156] Esta publicación también provee los polinucleótidos que codifican dichas monoaminoxidasas y los métodos para usar los polipéptidos en los procesos biocatalíticos descritos.

[0157] En algunos casos, las monoaminoxidasas descritas en estas especificaciones, son mejoradas en comparación con la enzima de SEC NRO:2, SEC NRO:6 o SEC NRO:32 con respecto a su velocidad de actividad enzimática, es decir, su velocidad de conversión de una amina de fórmula estructural I en la correspondiente imina de Fórmula estructural II. En algunos casos, las monoaminoxidasas son capaces de convertir el sustrato en producto a una velocidad que es al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces, 100 veces, o más que 100 veces la velocidad exhibida por la aminooxidasa de of SEC NRO:2, SEC NRO:16 y SEC NRO:32. Los polipéptidos ejemplares con estas propiedades incluyen, pero no se limitan a polipéptidos que comprenden una secuencia aminoacídica correspondiente a SEC NRO: 4, 8, 10, 12, 14,16, 18, 20, o 36.

[0158] En algunos casos, las monoaminoxidasas descritas aquí son capaces de convertir una amina de Fórmula estructural I en la correspondiente imina de Fórmula estructural II con un porcentaje de exceso diastereomérico de al menos el 95%. Los polipéptidos ejemplares con estas propiedades incluyen pero no se limitan a polipéptidos que comprenden una secuencia aminoacídica correspondiente a SEC NRO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, o 36.

[0159] En algunos casos, las aminooxidasa mejoradas de esta publicación se basan en la secuencia de Fórmulas

de SEC NRO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, o 20 y pueden comprender una secuencia aminoácida que son idénticas a la misma en al menos aproximadamente 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. Estas diferencias pueden ser una inserción, supresión, sustitución aminoácida, o cualquier combinación de dichos cambios. En algunos casos, las diferencias de secuencia aminoácida pueden comprender sustituciones aminoácidas no conservadoras, conservadoras, así como una combinación de no conservadoras y conservadoras. Aquí se describen varias posiciones de aminoácidos residuales donde pueden realizarse dichos cambios.

[0160] En algunos casos, una monoaminoxidasa mejorada de la publicación comprende una secuencia aminoácida en la que el aminoácido que corresponde al residuo 99 de SEC NRO: 2 y SEC NRO: 6, y el residuo 97 de SEC NRO: 32, glutamina, es sustituido por un aminoácido, es decir, ácido aspártico o glutámico. En un caso particular, el residuo glutamina es reemplazado por un residuo de ácido glutámico.

[0161] En algunos casos, una monoaminoxidasa mejorada de la publicación comprende una secuencia aminoácida en la que el aminoácido que corresponde al residuo 365 de SEC NRO: 2, y SEC NRO: 6, y residuo 363 de SEC NRO: 32, tirosina, es sustituido conservadoramente por un aminoácido aromático diferente, es decir fenilalanina o triptófano. En un caso particular, ese residuo tirosina es reemplazado por un residuo triptófano.

[0162] En algunos casos, una monoaminoxidasa mejorada de la publicación comprende una secuencia aminoácida en la que el aminoácido que corresponde al residuo 382 de SEC NRO: 2 y SEC NRO: 6, y residuo 380 de SEC NRO: 32, fenilalanina, es sustituido por un aminoácido no polar, es decir valina, isoleuquina, alanina, glicina, metionina o leuquina. En un caso particular, ese residuo de fenilalanina es reemplazado por un residuo de leuquina.

[0163] En algunos casos, una monoaminoxidasa mejorada de la publicación comprende una secuencia aminoácida en la que el aminoácido que corresponde al residuo 465 de SEC NRO: 2 y SEC NRO: 6, y el residuo 463 de SEC NRO: 32, serina, es sustituida por un aminoácido no polar, es decir valina, isoleuquina, alanina, metionina, leuquina o glicina. En un caso particular, ese residuo de serina es reemplazado por un residuo de glicina.

[0164] En algunos casos, una monoaminoxidasa mejorada de la publicación comprende una secuencia aminoácida en la que el aminoácido que corresponde al residuo 135 de SEC NRO: 2 y SEC NRO: 6, treonina, es sustituida conservadoramente por otro aminoácido polar, es decir serina, glutamina o asparagina. En un caso particular, ese residuo de treonina es reemplazado por un residuo de glutamina.

[0165] En algunos casos, una monoaminoxidasa de la publicación comprende una secuencia aminoácida en la cual el aminoácido que corresponde al residuo 284 de SEC NRO: 2 y SEC NRO: 6, asparagina, es sustituida por un aminoácido ácido, es decir ácido aspártico o ácido glutámico. En un caso particular, ese residuo de asparagina es reemplazado por un residuo de ácido glutámico.

[0166] En algunos casos, una monoaminoxidasa mejorada de la publicación comprende una secuencia aminoácida en la cual el aminoácido que corresponde al residuo 289 de SEC NRO: 2 y SEC NRO: 6, alanina, es sustituida conservadoramente por otro aminoácido no polar, es decir glicina, valina, leuquina, isoleuquina o metionina. En un caso particular, ese residuo de alanina es reemplazado por un residuo de valina.

[0167] En otros casos, una monoaminoxidasa mejorada de la publicación comprende una secuencia aminoácida en la cual el aminoácido que corresponde al residuo 384 de SEC NRO: 2, lisina, es sustituida conservadoramente por otro aminoácido polar, es decir serina, treonina, o glutamina. En un caso particular, ese residuo de lisina es reemplazado por un residuo de glutamina.

[0168] En algunos casos, una monoaminoxidasa mejorada de la publicación es una monoaminoxidasa que es homóloga de la monoaminoxidasa de *Aspergillus niger* (SEC NRO: 2) u homóloga de la monoaminoxidasa de *Aspergillus oryzae* (SEC NRO:32) y que lleva una o dos sustituciones aminoácidas correspondientes a aquellas detalladas aquí. Los homólogos ilustrativos incluyen las monoaminoxidasas de SEC NRO: 22, SEC NRO: 24, SEC NRO: 26, SEC NRO:28, SEC NRO: 30, SEC NRO: 32, y SEC NRO: 34. Por tanto, en algunos casos, una monoaminoxidasa mejorada de la publicación es una monoaminoxidasa seleccionada de las enzimas de SEC NRO: 22, SEC NRO: 24, SEC NRO: 26, SEC NRO: 28, SEC NRO: 30, SEC NRO: 32, y SEC NRO: 34 que lleva uno o más sustituciones aminoácidas correspondientes a aquellas aquí descritas.

Definiciones

[0169] Tal como se lo usa aquí, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

[0170] "Monoaminoxidasa" se refiere a un polipéptido que tiene la capacidad enzimática de oxidar un compuesto de Fórmula estructural I, *supra* al correspondiente producto de fórmula estructural II, *supra*.

El polipéptido típicamente utiliza un cofactor oxidado, tal como pero no limitado a adenina dinucleótido (FAD), adenina mononucleótido (FMN), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP). En un caso particular, el cofactor oxidado es FAD. Las monoaminoxidasas usadas aquí incluyen

las de ocurrencia natural (tipo salvaje) así como las de ocurrencia no natural, polipéptidos modificados generados por la manipulación humana.

[0171] “Secuencia de codificación” se refiere a la porción de ácido nucleico (por ejemplo, un gen) que encierra el código de una secuencia aminoácida de una proteína.

[0172] “De ocurrencia natural” o “tipo salvaje” se refiere a forma que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia polinucleótida de ocurrencia natural o de tipo salvaje es una secuencia presente en un organismo que puede ser aislada de su fuente en la naturaleza y que no ha sido intencionalmente modificada por manipulación humana.

[0173] “Recombinante” cuando se usa en referencia a, por ejemplo, una célula, ácido nucleico o un polipéptido, se refiere a un material o un material que corresponde a la forma natural o nativa del material, que ha sido modificado en una forma en que no existiría de otra manera en la naturaleza, o es idéntico al mismo pero producido o derivado de materiales sintéticos y/o por manipulación usando técnicas de recombinación. Los ejemplos no limitantes incluyen, entre otros, células recombinantes que expresan los genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan de otro modo a un nivel diferente.

[0174] “Porcentaje de identidad de secuencia” y “homología del porcentaje” aquí pueden usarse indistintamente para referirse a las comparaciones entre polinucleótidos y polipéptidos, y se determinan comparando dos secuencias alineadas en modo óptimo sobre una ventana comparativa, donde la porción de secuencia de polinucleótido o polipéptida en la ventana comparativa puede comprender adiciones o supresiones (es decir, lagunas) en comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje puede ser calculado determinando el número de posiciones al cual idéntico residuo de ácido nucleico o aminoácido producirá el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. De modo alternativo, el porcentaje puede ser calculado determinando el número de posiciones al cual ya sea idéntico residuo de base de ácido nucleico o aminoácido occurs en ambas secuencias o un residuo de base de ácido nucleico o aminoácido se alinea con una laguna para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Los expertos en la materia aprecian que haya disponible muchos algoritmos establecidos para alinear las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para comparación puede ser conducida, por ejemplo, por el algoritmo de homologación local de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, por el algoritmo de homologación de alineamiento de Needleman y Wunsch, 1970, .1. Mol. Biol. 48:443, por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el GCG Wisconsin Software Package), o por inspección visual (ver, generalmente, Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel y otros, eds., Current Protocols, obra en conjunto entre Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel). Ejemplos de algoritmos aptos para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, descritos en Altschul y otros, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul y otros, 1977, Nucleic Acids Res. 3389-3402, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST puede conseguirse públicamente a través del sitio web de the National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo incluye, primero, identificar pares de secuencias de alta puntuación (por sus siglas en inglés HSPs) al identificar palabras cortas de largo W en la secuencia query (sentencia u orden), las cuales tanto coinciden o satisfacen algún puntaje del umbral de valor positivo T al ser alineados con una palabra de la misma longitud en la secuencia de base de datos. T es denominada la palabra umbral de puntuación de vecindad (Altschul y otros, más arriba). Estas primeras respuestas positivas de palabras vecinales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar secuencias de alta puntuación HSPs más largas que los contengan. Las coincidencias de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia por tanto como pueda ser aumentado el puntaje de alineación acumulativa. Los puntajes acumulativos son calculados usando, para las secuencias nucleótidas, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). Para secuencias aminoácidas, se usa una matriz de puntaje para calcular el puntaje acumulativo. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; el puntaje acumulativo va hasta cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntaje negativo; o se alcanza el extremo de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST: W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias nucleótidas) usa por defecto un largo de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias aminoácidas, el programa BLASTP usa por defecto un largo de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntaje BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff, 1989, Proc Natl Acad Sci USA 89:10915). La determinación ejemplar de alineación de secuencia y porcentaje de identidad de secuencia pueden emplear los programas BESTFIT o GAP en el paquete GCG Wisconsin Software (Accelrys, Madison WI), usando los parámetros provistos por defecto. T es denominada la palabra umbral de puntuación de vecindad (Altschul y otros, más arriba). Estas primeras respuestas positivas de palabras vecinales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar secuencias de alta puntuación HSPs

más largos que los contengan. Las coincidencias de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia por tanto como pueda ser aumentado el puntaje de alineación acumulativa. Los puntajes acumulativos son calculados usando, para las secuencias nucleótidas, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0).
 5 Para secuencias aminoácidas, se usa una matriz de puntaje para calcular el puntaje acumulativo. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; el puntaje acumulativo va hasta cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntaje negativo; o se alcanza el extremo de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST: W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El
 10 programa BLASTN (para secuencias nucleótidas) usa por defecto un largo de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias aminoácidas, el programa BLASTP usa por defecto un largo de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntaje BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff, 1989, Proc Natl Acad Sci USA 89:10915). La determinación ejemplar de alineación de secuencia y porcentaje de identidad de secuencia pueden emplear los programas BESTFIT o GAP en el paquete GCG
 15 Wisconsin Software (Accelrys, Madison WI), usando los parámetros provistos por defecto.

[0175] "Secuencia de referencia" se refiere a una secuencia definida usada como base de una comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subgrupo de una secuencia más larga, por ejemplo, un segmento de un gen o polipéptido de largo completo. Generalmente, una secuencia de referencia es de al menos 20
 20 nucleótidos o residuos aminoácidos de largo, al menos 25 residuos de largo, al menos 50 residuos de largo o el largo completo del ácido nucleico o polipéptido. Dado que dos polinucleótidos o polipéptidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia completa) que es similar entre las dos secuencias, y (2) comprender además una secuencia que sea divergente entre las dos secuencias, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos o polipéptidos típicamente se realizan comparando las secuencias de
 25 los dos polinucleótidos en una "ventana comparativa" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia.

[0176] "Ventana comparativa" se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones nucleótidas contiguas o residuos aminoácidos donde una secuencia puede ser comparada con una secuencia de referencia de al menos
 30 20 nucleótidos contiguos o aminoácidos y donde la porción de la secuencia en la ventana comparativa puede comprender adiciones o supresiones (es decir huecos) de 20% o menos en comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La ventana comparativa puede ser más larga que 20 residuos contiguos, e incluye opcionalmente ventanas de 30, 40,
 35 50, 100 o más largas.

[0177] "Identidad sustancial" se refiere a la secuencia polinucleótida o polipéptida que tiene al menos 80% de la identidad de secuencia, al menos 85 por ciento de la identidad y 89 a 95 por ciento de la identidad de secuencia, más usualmente al menos 99 por ciento de la identidad de secuencia en comparación con una secuencia de
 40 referencia en una ventana comparativa de al menos 20 posiciones residuales, frecuentemente en una ventana de al menos 30-50 residuos, donde el porcentaje de identidad de secuencia es calculado comparando una secuencia de referencia con una secuencia que incluye las supresiones o adiciones que totalizan un 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia en la ventana comparativa. En casos específicos aplicados a polipéptidos, el término
 45 "Identidad sustancial" significa que las dos secuencias polipéptidas, cuando son alineadas en forma óptima, tales como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de lagunas por defecto, comparten al menos 80 por ciento de la identidad de secuencia, preferiblemente al menos 89 por ciento de la identidad de secuencia, al menos 95 por ciento de la identidad de secuencia o más (por ejemplo, 99 por ciento de identidad de secuencia). Preferiblemente, las posiciones residuales que no son idénticas difieren en sustituciones aminoácidas
 50 conservadoras.

[0178] "Correspondientes a," "referentes a," o "relativos a" usados en el contexto de la numeración de una secuencia dada de aminoácidos o polinucleótidos, se refieren a la numeración de los residuos de una secuencia de
 referencia específica cuando la secuencia aminoácida o polinucleótida dada es comparada con la secuencia de referencia. En otras palabras, el número de residuos o posición de los residuos de un polímero dado, se designa en
 55 relación con la secuencia de referencia más que por la posición numérica real del residuo dentro de la secuencia aminoácida o polinucleótida dada. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos dada, tal como la de una monoaminoxidasa manipulada genéticamente, puede alinearse con una secuencia de referencia mediante la introducción de lagunas para optimizar la combinación de residuos entre las dos secuencias. En estos casos, aunque hay lagunas presentes, la numeración de los residuos en una secuencia aminoácida o polinucleótida dada se hace en relación con la secuencia de referencia con la cual ha sido alineada.
 60

[0179] "Estereoselectividad" se refiere a la formación preferencial en una reacción química o enzimática de un estereoisómero por sobre otro. La estereoselectividad puede ser parcial, donde la formación de un estereoisómero puede ser favorecida por sobre otro, o puede ser completa donde se forma sólo un estereoisómero. Donde los estereoisómeros son enantiómeros, la estereoselectividad es denominada enantioselectividad, la fracción (típicamente informada como porcentaje) de un enantiómero en la suma de ambos. Comúnmente entre los expertos
 65

en la materia en modo alternativo (típicamente informado como porcentaje) se lo conoce como el exceso enantiomérico (e.e.) calculado del mismo de acuerdo con la fórmula $[\text{enantiómero mayor} - \text{enantiómero menor}] / [\text{enantiómero mayor} + \text{enantiómero menor}]$. Allí donde los estereoisómeros son diaestereoisómeros, la estereoselectividad es denominada diaestereoselectividad, la fracción (típicamente informada como porcentaje) de un diaestereoisómero en una mezcla de dos diaesterómeros, comúnmente se informa alternativamente como el exceso diaestereoisomérico (d.e.). Los excesos enantiomérico son tipos de exceso estereoisomérico.

[0180] “Altamente estereoselectivo”: se refiere a un polipéptido monoaminooxidasa capaz de convertir el sustrato en un producto correspondiente con al menos aproximadamente 99% de exceso estereoisomérico.

[0181] “Estereoespecificidad” se refiere a la conversión preferencial en una reacción química o enzimática de un estereoisómero sobre otro. La estereoespecificidad puede ser parcial, donde la conversión de un estereoisómero es favorecida por sobre otro, o puede ser completa donde sólo un estereoisómero sea convertido.

[0182] “Quemoselectividad” se refiere a la formación preferencial en una reacción química o enzimática de un producto por sobre otro.

[0183] “Propiedad mejorada de la enzima” se refiere a un polipéptido monoaminooxidasa que exhibe una mejora en cualquier propiedad de la enzima en comparación con una aminooxidasa de referencia. Para los polipéptidos monoaminooxidasa manipulados genéticamente descritos aquí, la comparación generalmente se realiza entre la enzima monoamina de tipo salvaje, aunque en algunos casos la monoaminooxidasa de referencia puede ser otra monoaminooxidasa mejorada con ingeniería genética. Las propiedades de las enzimas para las cuales es deseable una mejora incluyen pero no se limitan a la actividad enzimática (la cual puede ser expresada en términos de porcentaje de conversión del sustrato), estabilidad térmica, perfil de actividad de pH, requisitos de cofactor, refractividad a los inhibidores (por ejemplo inhibición de producto), estereoespecificidad, estereoselectividad (incluyendo enantioselectividad), solubilidad y estabilidad y nivel de expresión en una célula huésped

[0184] “Actividad enzimática aumentada” se refiere a una propiedad mejorada de los polipéptidos monoaminooxidasa manipulados genéticamente, los cuales pueden estar representados por un aumento en la actividad específica (por ejemplo, proteína producto producido/tiempo/peso) o un aumento en el porcentaje de conversión del sustrato al producto (por ejemplo, porcentaje de conversión de la cantidad inicial de sustrato al producto en un período de tiempo específico usando una cantidad específica de monoaminooxidasa) en comparación con la enzima monoaminooxidasa de referencia. En los ejemplos se proveen métodos ejemplares para determinar la actividad enzimática. Puede ser afectada cualquier propiedad relativa a la actividad enzimática, incluyendo las propiedades enzimáticas clásicas de K_m , V_{max} o k_{cat} , cambios que pueden llevar a una actividad enzimática aumentada. Las mejoras en la actividad enzimática pueden ser de 1,5 veces la actividad enzimática de la correspondiente monoaminooxidasa de tipo salvaje, hasta tanto como 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces o más actividad enzimática que la monoaminooxidasa que ocurre naturalmente u otra monoaminooxidasa manipulada genéticamente del cual se derivan los polipéptidos de las monoaminooxidasa. Los expertos en la materia entienden que la actividad de cualquier enzima tiene una difusión limitada tal que la tasa de rotación catalítica no puede exceder la tasa de difusión del sustrato, incluyendo cualquier cofactor requerido. El máximo teórico del límite de difusión, o k_{cat}/K_m , generalmente es de aproximadamente 108 a 109 ($M^{-1} s^{-1}$). De este modo, cualquier mejora en la actividad de la enzima de la monoaminooxidasa tendrá un límite superior relacionado con la tasa de difusión de los sustratos sobre los que actúa por la enzima de la monoaminooxidasa. La actividad de la monoaminooxidasa puede medirse usando los métodos publicados o adaptaciones de los mismos para medir la monoaminooxidasa, tal como pero no limitado a aquellos publicados en Zhou y otros (Zhou y otros “A One-Step Fluorometric Method for the Continuous Measurement of Monoamine Oxidase Activity,” 1997 Anal. Biochem. y Szutowicz y otros (Szutowicz y otros, “Colorimetric Assay for Monoamine Oxidase in Tissues Using Peroxidase and 2,2'-Azino(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) as Chromogen,” 1984, Anal. Biochem. 138:86-94). Las comparaciones de las actividades enzimáticas se realizan usando una preparación definida de enzima, una prueba definida en una condición establecida, y uno o más sustratos definidos, como se describe en detalle aquí o usando los métodos, por ejemplo, de Zhou y Szutowicz. Generalmente, cuando se compara los lisados, los números de células y la cantidad de proteínas probadas se determina así como el uso de sistemas de expresión idéntica y células huésped idénticas para minimizar las variaciones en la cantidad de enzima producida por las células huésped y presentes en los lisados.

[0185] “Conversión”: se refiere a la oxidación enzimática del sustrato al producto correspondiente. “Porcentaje de conversión” se refiere al porcentaje de sustrato que es oxidado al producto dentro de un período de tiempo bajo condiciones específicas. De este modo, la “actividad enzimática” o “actividad” de un polipéptido monoaminooxidasa puede ser expresado como “porcentaje de conversión” del sustrato en producto.

[0186] “Termoestable” se refiere a un polipéptido monoaminooxidasa que mantiene una actividad similar (más que 60% a 80%, por ejemplo) luego de la exposición a altas temperaturas (por ejemplo 40° a 80°C) por un período de tiempo (por ejemplo, 0,5 a 24 hs.) en comparación con una enzima no tratada.

[0187] “Solvente estable” se refiere a un polipéptido monoaminooxidasa que mantiene una actividad similar (más que 60% a 80%, por ejemplo) luego de la exposición a concentraciones variadas (por ejemplo 5 a 99%) de solvente

(alcohol isopropílico, tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, acetona, tolueno, butilacetato, metil tert-butil éter, etc.) durante un período de tiempo (por ejemplo, 0,5 a 24 hs) en comparación con una enzima no tratada.

[0188] "pH estable" se refiere a un polipéptido monoaminooxidasa que mantiene una actividad similar (más que 60% a 80%, por ejemplo) luego de la exposición a pH alto o bajo (por ejemplo 4,5 a 6 u 8 a 12) por un período de tiempo (por ejemplo, 0,5 a 24 hs) en comparación con una enzima no tratada.

[0189] "Termoestable y solvente estable" se refiere a un polipéptido monoaminooxidasa que es tanto termoestable como solvente estable.

[0190] "Derivado de" tal como se lo usa aquí en el contexto de enzimas monoaminooxidasa manipuladas genéticamente, identifica la enzima monoaminooxidasa de origen, y/o el gen que codifica dicha enzima monoaminooxidasa, sobre el cual se basa la manipulación genética. Por ejemplo, la enzima monoaminooxidasa manipulada genéticamente de SEC NRO:8 se obtuvo evolucionando artificialmente, a través de varias generaciones, el gen que codifica la enzima monoaminooxidasa *Aspergillus niger* de SEC NRO:2. De este modo, esta enzima monoaminooxidasa manipulada genéticamente es "derivada de" la monoaminooxidasa tipo salvaje de SEC NRO:2.

[0191] "Aminoácido o residuo hidrofílico" se refiere a un aminoácido o residuo que tiene una cadena lateral que exhibe una hidrofobia menor a cero de acuerdo con la escala de hidrofobia normalizada de consenso de Eisenberg y otros, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Los aminoácidos hidrofílicos codificados incluyen L-Thr (T), L-Ser (S), L-His (H), L-Glu (E), L-Asn (N), L-Gln (Q), L-Asp (D), L-Lys (K) y L-Arg (R).

[0192] "Aminoácido o residuo ácido" se refiere a un aminoácido hidrofílico o un residuo que tiene una cadena lateral que exhibe un valor de pK menor de aproximadamente 6 cuando el aminoácido está incluido en un péptido o polipéptido. Los aminoácidos ácidos típicamente tienen cadenas laterales cargadas negativamente en el pH fisiológico debido a asociación con la pérdida del ion hidrógeno. Los aminoácidos ácidos codificados genéticamente incluyen L-Glu (E) and L-Asp (D).

[0193] "Aminoácido o residuo básico" se refiere a un aminoácido hidrofílico o un residuo que tiene una cadena lateral que exhibe un valor de pK mayor de aproximadamente 6 cuando el aminoácido está incluido en un péptido o polipéptido. Los aminoácidos básicos típicamente tienen cadenas laterales cargadas positivamente en el pH fisiológico debido a la asociación con el ion hidronio. Los aminoácidos básicos codificados genéticamente incluyen L-Arg (R) y L-Lys (K).

[0194] "Aminoácido o residuo polar" se refiere a un aminoácido hidrofílico o un residuo que tiene una cadena lateral sin carga en el pH fisiológico, pero que tiene al menos una unión en el que el par de electrones compartidos en común por dos átomos es mantenido en forma más cercana a uno de los átomos. Los aminoácidos polares genéticamente codificados incluyen L-Asn (N), L-Gln (Q), L-Ser (S) y L-Thr (T).

[0195] "Aminoácido o residuo hidrofóbico" se refiere a un aminoácido o residuo que tiene una cadena lateral que exhibe una hidrofobia mayor a cero de acuerdo con la escala de hidrofobia normalizada de consenso de Eisenberg y otros, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Los aminoácidos hidrofóbicos codificados genéticamente incluyen L-Pro (P), L-Ile (I), L-Phe (F), L-Val (V), L-Leu (L), L-Trp (W), L-Met (M), L-Ala (A) y L-Tyr (Y).

[0196] "Aminoácido o residuo aromático" se refiere a un aminoácido o residuo hidrófilo o hidrófobo que tiene una cadena lateral que incluye al menos un anillo aromático o heteroaromático. Aminoácidos aromáticos codificados genéticamente incluyen la L-Phe (F), L-Tyr (Y) y L-Trp (W). Aunque debido a la pKa de su átomo de nitrógeno heteroaromático L-His (H) se clasifica a veces como un residuo básico, o como un residuo aromático como su cadena lateral incluye un anillo heteroaromático, histidina en este documento se clasifica como un residuo hidrófilo o como un "residuo constreñido" (ver más abajo).

[0197] "Aminoácido constreñido o residuo" se refiere a un aminoácido o residuo que tiene una geometría constreñida. En la presente, residuos constreñidos incluyen, L-pro (P) y L-his (H). La histidina tiene una geometría constreñida dado a que presenta un anillo de imidazol relativamente pequeño. La prolina tiene una geometría constreñida dado a que también presenta un anillo de cinco miembros.

[0198] "Aminoácido o residuo no polar" se refiere a un aminoácido o residuo hidrofóbico que presenta una cadena lateral sin carga en el pH fisiológico y que presenta enlaces en los que el par de electrones comúnmente compartido por dos átomos es generalmente retenido equitativamente por cada uno de los dos átomos (ej. La cadena lateral es no polar). Los aminoácidos genéticamente codificados no polares incluyen L-Gly (G), L-Leu (L), L-Val (V), L-Ile (I), L-Met (M) y L-Ala (A).

[0199] "Aminoácido o residuo alifático" se refiere a un aminoácido o residuo hidrofóbico que presenta una cadena lateral de hidrocarburo alifático. Los aminoácidos alifáticos genéticamente codificados incluyen L-Ala (A), L-Val (V), L-Leu (L), y L-Ile(I).

[0200] “Cisteína”. El aminoácido L-Cys (C) no es esencial dado que puede formar puentes disulfuro con otros aminoácidos L-Cys u otros aminoácidos que contienen sulfanil o sulfhídrico. Los “residuos en forma de Cisteína” incluyen cisteína y otros aminoácidos que contienen fracciones de sulfhídrico que hacen posible la formación de puentes disulfuro. La posibilidad de L-Cys (C) (y otros aminoácidos con –SH conteniendo cadenas laterales) de existir en un péptido como el reducido –SH o en la forma del puente disulfuro oxidado afecta en cuanto L-Cys (C) contribuye netamente al carácter hidrofóbico o hidrofílico de un péptido. Mientras que L-Cys (C) exhibe una hidrofobicidad del 0.29 según la escala de consenso normalizada de Eisenberg (Eisenberg y otros, 1984, supra) debe ser entendido que para los propósitos de la presente publicación L-Cys (C) será categorizada en su propio y único grupo.

[0201] “Pequeño aminoácido o Residuo” se refiere a un aminoácido o residuo que contiene una cadena lateral la cual se encuentra compuesta por un total de tres o menos carbonos y/o heteroátomos (excluyendo a un-carbono e hidrógenos). Los pequeños aminoácidos o residuos podrían ser posteriormente categorizados como alifáticos, no polares, polares o pequeños aminoácidos ácidos o residuos, en concordancia con las definiciones antedichas. Los pequeños aminoácidos genéticamente codificados incluyen L-Ala (A), L-Val (V), L-Cys (C), L-Asn (N), L-Ser (S), L-Thr (T) y L-Asp (D).

[0202] “Aminoácido Hidroxilados o Residuo” se refiere a un aminoácido que contiene un hidroxilo (-OH) medio. Entre los aminoácidos hidroxilados, genéticamente codificados se encuentran L-Ser (S) L-thr (T) and L-Tyr (Y).

[0203] Las sustituciones de aminoácidos “Conservadoras” o mutaciones se refieren a la intercambiabilidad de residuos que contienen cadenas laterales similares, y por lo tanto implica típicamente la sustitución del aminoácido en el polipéptido con aminoácidos dentro del mismo o una clase definida similar de aminoácidos. Sin embargo, según se describe, las mutaciones conservadoras no incluyen sustituciones de hidrofóbico a hidrofóbico, hidrofóbico a hidrofóbico, hidroxilado a hidroxilado, o residuo pequeño a residuo pequeño, si la mutación conservadora puede en lugar ser una sustitución de un alifático a un alifático, no polar a no polar, polar a polar, ácido a ácido, básico a básico, aromático a aromático, o constreñido a un residuo constreñido. Mas extensamente, según se describe, A, V, L o I pueden ser conservadoramente mutados de ya sea un residuo alifático o a otro residuo no polar. La tabla numero 1 debajo muestra sustituciones conservadoras ejemplarmente.

Tabla 1: Substituciones Conservadoras

Residuo	Posible Mutaciones Conservadoras
A, L, V, I	Otros alifáticos (A, L, V, I) Otros no polares (A, L, V, I, G, M)
G, M	Otros no polares (A, L, V, I, G, M)
D, E	Otros ácidos (D, E)
K, R	Otros básicos (K, R)
P, H	Otros constreñidos (P,H)
N, Q, S, T	Otros polares (N,Q, S, T)
Y, W, F	Otros aromáticos (Y, W, F)
C	Ninguno

[0204] “Sustituciones no conservadoras” se refiere a la sustitución o mutación de un aminoácido en el polipéptido con un aminoácido con cadena lateral con propiedades significativamente diferentes. Las sustituciones no conservadoras pueden utilizar aminoácidos entre, más bien que dentro, de los grupos definidos previamente. En una realización, una mutación no conservadora afecta (a) la estructura de la columna péptida en el área de la sustitución (ej. Prolina por glicina) (b) la carga de hidrofobicidad, o (c) el volumen de la cadena lateral.

[0205] “Supresión” se refiere a la modificación del polipéptido debido a la eliminación de uno o más aminoácidos del polipéptido de referencia. Las supresiones pueden ceder la eliminación de 1 o más aminoácidos, 2 o más aminoácidos, 5 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos, o 20 o más aminoácidos, hasta el 10% del número total de aminoácidos, o hasta el 20% del número total de aminoácidos que constituyen la enzima de referencia al mismo tiempo reteniendo actividad enzimática y/o reteniendo las propiedades mejoradas de una enzima monoaminoxidasa diseñada. Las eliminaciones pueden ser dirigidas hacia las porciones internas y/o porciones terminales del polipéptido. En varias realizaciones, la eliminación puede comprender un segmento continuo o discontinuo.

[0206] “Inserción” se refiere a la modificación del polipéptido por adición de uno o más aminoácidos desde el polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, las enzimas monoaminoxidasas mejoradas diseñadas comprenden inserciones de uno o más aminoácidos a las monoaminoxidasas que naturalmente ocurren, así como también inserciones de uno o más aminoácidos a otras monoaminoxidasas polipéptidas mejoradas. Las inserciones pueden darse en las porciones internas del polipéptido o en la terminal carboxi o amino. Las inserciones, como aquí descriptas, incluyen fusiones proteicas como es sabido en el arte. La inserción puede ser un segmento continuo de

aminoácidos o estar separada por uno o más aminoácidos en el polipéptido de origen natural.

[0207] “Diferente de” o “Difiere de” con respecto a la secuencia de referencia designada se refiere a la diferencia de un aminoácido dado o secuencia polinucleótida cuando esta se alinea con la secuencia de referencia. Generalmente, las diferencias pueden ser determinadas cuando las dos secuencias están óptimamente alineadas. Las diferencias incluyen inserciones, supresiones, o sustituciones de residuos aminoácidos en comparación a la secuencia de referencia.

[0208] “Fragmento” como se describe a continuación, se refiere al polipéptido que tienen una terminal amino y/o supresión de terminal carboxi, pero donde la secuencia de aminoácido restante es idéntica a la posición correspondiente en la secuencia. Los fragmentos pueden ser de por lo menos 14 aminoácidos de largo, 20 aminoácidos de largo, 50 aminoácidos de largo o más, y hasta el 70%, 80%,90%,95%,98% y 99% del cuerpo entero del polipéptido monoaminooxidasa.

[0209] “Polipéptido aislado” se refiere a un polipéptido que es substancialmente separado de otros contaminadores que naturalmente lo acompañan, e. J, proteínas, lípidos, y poli nucleótidos. El termino comprende a los poli péptidos que han sido removidos o purificados de su medio ambiente natural o sistema de expresión (e. J, célula huésped o síntesis in vitro). La monoaminooxidasa mejorada podría estar presente dentro de una célula, presente en el medio celular , o preparada en varias formas, tal como en lisados o preparaciones aisladas. Como tal, en algunas realizaciones, la monoaminooxidasa mejorada puede ser un polipéptido aislado.

[0210] “Polipéptido sustancialmente puro” se refiere a una composición en la cual las especies polipeptídicas son la especie presente predominante (e. J, en una base molar o de peso es más abundante en la composición que cualquier otra especie individual macromolecular), y es generalmente una composición substancialmente purificada cuando las especies objeto comprenden por lo menos el 50 por ciento de las especies macromoleculares presentes por masa o % de peso. Generalmente, una composición sustancialmente pura de monoaminooxidasa comprenderá alrededor de 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, y alrededor de 98% o más de todas las especies macromoleculares por masa o %de peso presente en la composición. En algunas realizaciones, la especie objeto es purificada a una homogeneidad esencial (ej., las especies contaminantes no pueden ser detectadas en la composición por métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente de una sola especie macromolecular. Las especies solventes, moléculas pequeñas (<500 Daltons), y especies iónicas no se consideran especies macromoleculares. En algunas realizaciones, el polipéptido aislado de monoaminooxidasa mejorada es una composición de polipéptido substancialmente puro.

[0211] “Hibridación rigurosa” es utilizada en la presente para referirse a las condiciones bajo la cual los ácidos híbrido nucleicos son estable. Como es sabido para los expertos en este arte, la estabilidad de un híbrido se refleja en la temperatura de fusión (Tm). En general, la estabilidad de un híbrido es una función de la fuerza iónica, temperatura, contenido, y la presencia de agentes caotrópicos. Los valores Tm para polinucleótidos pueden ser calculados usando métodos reconocidos para predecir temperaturas de fusión (ver ej., Baldino y otros, Methods in Enzymology 168:761-777; Bolton y otros, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:1390; Bresslauer y otros, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci USA 83:8893-8897; Freier y otros, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci USA 83:9373-9377; Kierzek y otros, Biochemistry 25 :7840-7846; Rychlik y otros, 1990, Nucleic Acids Res 18:6409-6412 (erratum, 1991, Nucleic Acids Res 19:1698); Sambrook y otros, supra); Suggs y otros, 1981, In Developmental Biology Using Purified Genes (Brown y otros, eds), pp. 683-693, Academic Press; and Wetmur, 1991, Crit Rev Biochem Mol Biol 26:227-259. Todas las publicaciones aquí incorporadas como referencia) En algunas realizaciones, el poli nucleótido codifica el polipéptido descrito en este documento y se hibrida bajo condiciones definidas, como moderadamente rigurosas o altamente rigurosa, al complementarse de una secuencia codificando una enzima monoaminooxidasa de la presente manifestación.

[0212] “Rigurosidad de hibridación” se relaciona a tales condiciones lavables de los ácidos nucleicos. Generalmente, las reacciones de hibridación son realizadas bajo condiciones de baja rigurosidad, seguidas de lavados de alta pero variante rigurosidad. El término “hibridación rigurosa moderada” se refiere a las condiciones que permiten al ADN objetivo unirse a un ácido nucleico complementario que tiene 60% de identidad, preferentemente entre 75% de identidad, entre 85% de identidad sobre el ADN objetivo; con más del 90% identidad para el objetivo polinucleótido. Ejemplarmente las condiciones moderadamente rigurosas son condiciones equivalentes a la hibridación en el 50% formamida, 5X solución de Denhart, SXSSPE, 0.2%SDS a 42°C., seguido de lavable en 0.2XSSPE, 0.2%SDS, a 42°C. “Hibridación de alta rigurosidad” se refiere generalmente a condiciones que se encuentran entre 10°C o menos de la temperatura de fusión térmica Tm, tal como se determina bajo la condición de solución para una secuencia poli nucleica definida. En algunas realizaciones, una condición altamente rigurosa se refiere a condiciones que permiten la hibridación de solo las secuencias de ácidos nucleicos que forman híbridos estables en 0.018M NaCl a 65°C (ej., si un híbrido no es estable en 0.018M NaCl a 65°C, no será estable bajo condiciones altamente rigurosas, como contemplado en este documento) Las condiciones altamente rigurosas pueden ser proveídas, por ejemplo, por hibridación en condiciones equivalentes a 50% formamida, 5X solución de Denhardt, SXSSPE, 0.2% SDS a 42°C, seguido por lavable en 0.1XSSPE, y 0.1% SDS a 65°C. Otras condiciones de hibridación altamente rigurosas, tanto como condiciones rigurosamente moderadas, son descritas en las referencias citadas anteriormente.

[0213] Polinucleótidos “Heterólogo” se refiere a cualquier polinucleótido que es introducido en una célula huésped por medio de técnicas de laboratorio, e incluye polinucleótidos que son removidos por una célula huésped, sometida a la manipulación de laboratorio, y luego reintroducida a la célula huésped.

[0214] “Codón Optimizado” se refiere a los cambios en los codones de los polinucleótidos codificando una proteína a esos preferentemente usados en un organismo particular de tal manera que la proteína codificada es eficazmente expresada en el organismo de interés. Aunque el código genético es degenerado, en cuanto a que la mayoría de los aminoácidos son representados por varios codones, llamados codones “sinónimos” o “sinónimos”, es bien sabido que el uso del codón por organismos particulares no es aleatorio y se inclina hacia codones triples particulares. Este uso inclinante del codón puede ser más alto en referencia en cuanto a un gen dado, genes de función común u origen ancestral, proteínas altamente expresadas versus proteínas con bajo número de copias, y las regiones agregadas de proteínas codificadas de un genoma de un organismo. En algunas realizaciones, el polinucleótido codificando las enzimas de monoaminoxidasa puede ser codón optimizado para la producción óptima del organismo huésped seleccionado para la expresión.

[0215] “Condonos preferidos, óptimos, de alto uso, y parcial” se refiere a la intercambiabilidad de codones que son usados a alta frecuencia en las regiones codificantes de las proteínas más que otros codones que codifican el mismo aminoácido. Los codones preferidos pueden ser determinados en relación al uso de codones de un solo gen, un conjunto de genes de común función u origen, genes altamente expresados, la frecuencia de codón en el agregado de las regiones codificadas de la proteína de organismo en su totalidad, frecuencia de codón en el agregado de las regiones codificadas de las proteínas de organismos relacionado, o combinaciones de los mismos. Los codones cuya frecuencia aumenta con el nivel de expresión de un gen son típicamente codones óptimos para la expresión. Una variedad de métodos son reconocidos para determinar la frecuencia de un codón (ej., el uso del codón, sinónimo relativo del uso del codón) y la preferencia de codón en organismos específicos, incluyendo análisis multivariado, por ejemplo, usando análisis de grupo o análisis de correspondencia, y el número eficaz de uso de codones en un gen (ver GCG CodonPreference, Genetics Computer Group Wisconsin Package; CodonW, John Peden, University of Noflingham; McInerney, J. O, 1998, Bioinformatics 14:372-73; Stenico y otros, 1994, Nucleic Acids Res. 22:2437-46; Wright, F., 1990, Gene 87:23-29). Las tablas de uso de codón están disponibles para una creciente lista de organismos (ver ejemplos Wada y otros, 1992, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118; Nakamura y otros, 2000, Nucl. Acids Res. 28:292; Duret, y otros, supra; Henaut and Danchin, “Escherichia coli and Salmonella,” 1996, Neidhardt, y otros Eds., ASM Press, Washington DC, p. 2047-2066. La fuente de datos para obtener el uso de codón puede depender de cualquier secuencia nucleótida disponible capaz de codificar para una proteína. Estos conjuntos de datos incluyen secuencias de ácidos nucleicos reconocidas por codificar proteínas expresadas (ej., secuencias completas de proteínas codificadas- CDS), etiquetas de secuencias expresadas (ESTS), o regiones previstas codificadas de secuencias genómicas (ver por ejemplo, Mount, D., Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis, Capítulo 8, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; Uberbacher, E. C., 1996, Methods Enzymol. 266:259-281; Tiwari y otros, 1997, Comput. Appl. Biosci.13:263-270).

[0216] “Secuencia de control” es definida en la presente para incluir todos los componentes, que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido de la presente publicación. Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia propéptida, promotor, secuencia de señal péptida y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada de transcripción y traducción. Las secuencias de control pueden ser provistas con enlaces a fin de introducir sitios que faciliten la ligadura de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia del ácido nucleico que codifica un polipéptido.

[0217] “Unido operativamente” se define en la presente como una configuración en la que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición relativa a la secuencia codificante de la secuencia de ADN de tal manera que la secuencia de control dirige la expresión de un polinucleótido y/o polipéptido.

[0218] “Secuencia promotora” es una secuencia de ácido nucleico que es reconocida por una célula huésped para la expresión de la región codificada. La secuencia de control puede comprender una secuencia promotora apropiada. La secuencia promotora contiene control de secuencias de transcripciones, las cuales median la expresión del polipéptido. Cualquier secuencia de ácido nucleico puede ser la promotora que muestre actividad de transcripción en la célula huésped de elección incluyendo mutante, truncado y promotores híbridos, y podría ser obtenidos de genes codificando polipéptidos extra celulares o intra celulares tanto homólogos como heterólogos a la célula huésped.

[0219] “(C1-C10)alquilo” corresponde a una cadena lineal o ramificada de hidrocarburos no cíclicos que forman de 1 a 10 átomos de carbono. Representativamente la cadena lineal de -(C1-C10) alquilo incluye -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo, y -n-decilo. Un alquilo ramificado corresponde a uno o más cadenas lineales -(C1-C8) de grupos alquilo, como -metilo, -etilo, o -propilo, que remplazan uno o ambos hidrógenos en un grupo -CH2- de una cadena alquilo lineal. Un hidrocarburo no cíclico ramificado corresponde a que una o más cadenas lineales de grupos alquilo -(C1-C10), tales como -metilo, -etilo, -propilo,

- reemplazan uno o ambos hidrógenos en un grupo de $-CH_2-$ de una cadena lineal de hidrocarbano no cíclica. El alquilo $-(C1-C10)$ representativamente ramificado incluye iso-propilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, iso-pentilo, neopentyl, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1, 1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-mentilpentilo, 3-mentilpentilo, 4-mentilpentilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 3-etilbutilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-metilhexilo, 2-metilhexilo, 3-metilhexilo, 4-metilhexilo, 5-metilhexilo, 1,2-dimetilpentilo, 1,3-dimetilpentilo, 1,2-dimetilhexilo, 1,3-dimetilhexilo, 3,3-dimetilhexilo, 1,2-dimetilheptilo, 1,3-dimetilheptilo, y 3,3-dimetilheptilo.
- 5
- 10 **[0220]** “ $-(C1-C6)$ alquilo” corresponde a una cadena lineal o ramificada de hidrocarbano no cíclico teniendo desde 1 a 6 átomos de carbono. La cadena lineal representativa $-(C1-C6)$ alquilo incluye -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, y -n-hexilo. El alquilo $(C1-C6)$ representativamente ramificada incluye iso-propilo, -sec-butilo, -iso-butilo, -terc-butilo, iso-pentilo, -neopentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 3-etilbutilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, y 3,3-dimetilbutilo.
- 15
- 20 **[0221]** “ $-(C1-C4)$ alquilo” corresponde a una cadena lineal o ramificada de hidrocarbano no cíclico teniendo desde 1 a 4 átomos de carbono. La cadena lineal representativa alquilo $-(C1-C4)$ incluye -metilo, -etilo, -n-propilo, y -n-butilo. El alquilo representativo ramificado $-(C1-C4)$ incluye -iso-propilo, -sec-butilo, -iso-butilo, y -terc-butilo.
- 25 **[0222]** “ $-(C1-C3)$ alquilo” corresponde a una cadena lineal o ramificada de hidrocarbano no cíclico conteniendo desde 1 a 3 átomos de carbono. La cadena representativa lineal alquilo $(C1-C3)$ incluye -metilo, -etilo, y -n-propilo. El alquilo $-(C1-C3)$ representativamente ramificada incluye -iso-propilo.
- 30 **[0223]** “ $-(C1-C2)$ alquilo” corresponde a una cadena lineal no cíclica de hidrocarbano teniendo 1 o 2 átomos de carbono. La cadena lineal representativa $-(C1-C2)$ alquilo incluye -metilo y -etilo.
- 35 **[0224]** “ $(C2-C10)$ alqueno” corresponde a una cadena lineal o ramificada no cíclica de hidrocarbano teniendo de 2 a 10 átomos de carbono e incluye por lo menos un enlace doble carbono-carbono. Un alqueno ramificado corresponde a uno o más grupos de cadenas lineales de grupos $-(C1-C8)$ alquilo, tal como -metilo, -etil, o -propilo, reemplaza uno o ambos hidrógenos en un grupo $-CH_2$ o $CH=$ de la cadena lineal alqueno. La cadena representativa lineal y ramificada $(C2-C10)$ alquenos incluyen -vinilo, -alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, -iso-butenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metilo-1-butenilo, 2-metilo-2-butenilo, -2,3-dimetilo-2-butenilo, -1-hexenilo, -2-hexenilo, -3-hexenilo, -1-heptenilo, -2-heptenilo, -3-heptenilo, -1-octenilo, -2-octenilo, -3-octenilo, -1-nonenilo, -2-nonenilo, -3-nonenilo, -1-decenilo, -2-decenilo, -3-decenilo, y similares.
- 40 **[0225]** “ $(C2-C6)$ alqueno” corresponde a una cadena lineal o ramificada no cíclica de hidrocarbano teniendo desde 2 a 6 átomos de carbono e incluye por lo menos un enlace doble carbono-carbono. La cadena lineal representativa y ramificada $-(C2-C6)$ alquenos incluye -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -iso-butenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metilo-1-butenilo, -2-metilo-2-butenilo, -2,3-dimetilo-2-butenilo, -1-hexenilo, -2-hexenilo, -3-hexenilo, y similares.
- 45 **[0226]** “ $(C2-C10)$ alquino” corresponde a una cadena lineal o ramificada no cíclica de hidrocarbano teniendo desde 2 a 10 átomos de carbono e incluyendo por lo menos un enlace triple de carbono-carbono. Un alquino ramificado corresponde a uno o más grupos de cadenas lineales $-(C1-C8)$ alquilo, tal como -metilo, -etil, o -propilo, reemplaza uno o ambos hidrógenos en un grupo de cadena alquino $-CH_2-$. La cadena lineal y ramificada $(C2-C10)$ alquino incluye -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metilo-1-butinilo, -4-pentinilo, -1-hexinilo, -2-hexinilo, -5-hexinilo, -1-heptinilo, -2-heptinilo, -6-heptinilo, -1-octinilo, -2-octinilo, -7-octinilo, -1-noninilo, -2-noninilo, -8-noninilo, -1-decinilo, -2-decinilo, -9-decinilo, y similares.
- 50 **[0227]** “ $(C2-C6)$ alquino” corresponde a una cadena lineal o ramificada no cíclica de hidrocarbano teniendo de 2 a 6 átomos de carbono e incluyendo por lo menos un enlace triple carbono-carbono. La cadena representativa lineal y ramificada $(C2-C6)$ alquino incluye -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metilo-1-butinilo, -4-pentinilo, -1-hexinilo, -2-hexinilo, -5-hexinilo, y similares.
- 55 **[0228]** “ $(C1-C6)$ alcoxi” corresponde a una cadena lineal o ramificada no cíclica de hidrocarbano que tiene uno o más grupos y de 1 a 6 átomos de carbono. La cadena lineal y ramificada representativa $(C1-C6)$ alcoxi incluye -metoxi, -etoxi, -mitoximetilo, -2-mitoxietil, -5-mitoxipentilo, -3-etoxibutilo, y similares.
- 60 **[0229]** “ $(C3-C12)$ cicloalquilo” corresponde a un hidrocarbano saturado monocíclico que contiene de 3 a 12 átomos de carbono. Los $(C3-C12)$ cicloalquilos representativos son -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclohexilo, -cicloheptil, -ciclooctil, -ciclononil, -ciclodecil, y -ciclododecil.
- 65 **[0230]** “ $(C4-C8)$ cicloalquilo” o “anillo cicloalquilo de 4-a 8-miembros” corresponde a un hidrocarbano monocíclico saturado que contiene de 4 a 8 átomos de carbono. Los $-(C4-C8)$ cicloalquilos representativos son -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclohexilo, -cicloheptil, y -ciclooctil.

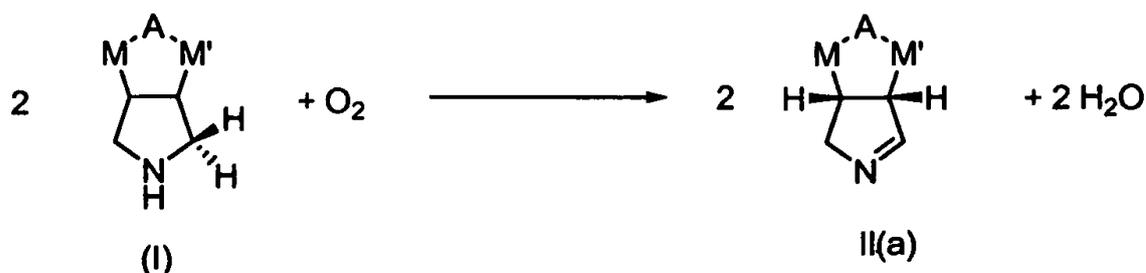
- [0231]** “-(C3-C8)cicloalquilo” corresponde a un hidrocarbano monocíclico saturado que contiene de 3 a 8 átomos de carbono. Los -(C3-C8) cicloalquilos representativos incluyen -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclohexilo, -cicloheptil, y -ciclooctil.
- 5 **[0232]** “-(C3-C7)cicloalquilo” corresponde a un hidrocarbano monocíclico saturado que contiene de 3 a 7 átomos de carbono. Los (C3-C7) cicloalquilos representativos incluyen -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclohexilo, y cicloheptil.
- 10 **[0233]** “-(6 a 10 miembros) Heterobicíclico” o “(6 a 10 miembros)biciclo heterociclo” corresponde a un miembro anillo de 6 a 10 bicíclico, heterocíclico que ya sea saturado, no saturado no aromatizado, o aromatizado. Un-(6 a 10 miembros) heterobicíclico que contiene de 1 a 4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, que pueden ser cuaternizados como; oxígeno, y sulfuro, incluyendo sulfóxido y sulfona. El-(6 a 10 miembros) heterobicíclico puede ser adjuntado vía un átomo de nitrógeno o carbono. Los-(6 a 10 miembros) heterocíclicos representativos incluyen -3-azabicyclo [3.1.0]hexano, -quinolinilo,-isoquinolinilo,-cromonilo,-coumarinilo,-indolilo,-indolizínilo, benzo[b]furanilo, benzo[b]tiofenilo,-indazolilo,-purínilo,-4H-quinolizínilo, isoquinolilo,-quinolilo,-ftalazínilo,-naftiridinilo, - carbazolilo, carbolínilo-P-, -indolinilo,-isoindolinilo, 1,2,3,4-tetrahidroquinolinilo, 1,2,3,4 -tetrahidroisoquinolinilo, pirrolopirrolil y similares.
- 15
- 20 **[0234]** “-CH₂(Halo)” corresponde a un grupo metilo donde uno de los hidrógenos del grupo metilo ha sido reemplazado con uno halógeno. Los grupos representativos -CH₂ (halo) incluyen -CH₂ F, -CH₂Cl, -CH₂Br, y -CH₂I.
- 25 **[0235]** “-CH(halo)₂” corresponde a un grupo metilo donde dos de los hidrógenos del grupo metilo han sido reemplazados con un halógeno. Los grupos representativos -CH(halo)₂ incluyen -CHF₂, -CHCl₂, -CHBr₂, -CHBrCl, -CHClI, y -CHI₂.
- 30 **[0236]** “-C(halo)₃” corresponde a un grupo metilo donde cada hidrogeno del grupo metilo ha sido reemplazado con un halógeno. Los grupos representativos -C(halo)₃ incluyen -CF₃, -CCl₃, -CBr₃, y -CI₃.
- 35 **[0237]** “Halógeno” o “halo” corresponde a -F, -Cl, -Br, o -I.
- 40 **[0238]** “Oxo”, “=O”, y similares como se usan en esta publicación corresponden a un átomo de oxígeno doblemente enlazado a un carbono u otro elemento.
- 45 **[0239]** Cuando un primer grupo es “sustituido con uno o más” grupos secundarios, uno o más átomos de hidrogeno del primer grupo es reemplazado con un número correspondiente de los grupos secundarios. Cuando el número de los grupos secundarios es dos o más, cada grupo secundario puede ser el mismo o diferente.
- 50 **[0240]** En un caso, un primer grupo es sustituido con hasta tres grupos secundarios.
- 55 **[0241]** En otro caso, un primer grupo es sustituido con uno o dos grupos secundarios.
- [0242]** En otro caso, un primer grupo es sustituido con solo un grupo secundario.
- 60 **[0243]** Como es utilizado en la presente, los términos “estereoisómero”, “forma estereoisomérica”, y similares son términos generales para todos los isómeros de moléculas individuales que difieren solo en la orientación de sus átomos en espacio. Esto incluye enantiómeros e isómeros de compuestos con más de un centro quiral que no son imágenes reflejadas de otro (“diaesterómeros”).
- 65 **[0244]** El término “centro quiral” se refiere a un átomo de carbono al que están unidos cuatro grupos diferentes.
- [0245]** El término “enantiómero” o “enantiomérico” se refiere a una molécula que no es superponible en su imagen especular y por lo tanto ópticamente activa donde el enantiómero rota el plano de luz polarizada en una dirección y su imagen especular rota el plano de luz polarizada en la dirección opuesta.
- [0246]** El término “racémico” se refiere a una mezcla de partes iguales de enantiómeros que es ópticamente inactiva.
- [0247]** El término “resolución” se refiere a la separación o concentración o el agotamiento de uno o dos formas entanioméricas de una molécula.
- [0248]** “Sustancialmente enantionaméricamente puro”, como presentado en la presente corresponde a que el enantiómero indicado de un compuesto está presente a una mayor medida o grado que otro enantiómero del mismo compuesto. En consecuencia, en realizaciones particulares, un compuesto sustancialmente enantioméricamente puro está presente en 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de exceso enantiomérico sobre otros enantiómeros del mismo compuesto.

[0249] "Sustancialmente estereoméricamente puro" como es utilizado en esta publicación corresponde a que el enantiómero indicado o diaestereoisómero de un compuesto está presente en mayor medida o grado que otro enantiómero o diaestereoisómero del mismo compuesto. Como se ha señalado anteriormente con respecto a "estereoselectividad", exceso enantiomérico y el exceso de diaestereoisómero son tipos de exceso de estereomérico. En consecuencia, en realizaciones particulares, un compuesto sustancialmente estereoméricamente puro está presente en 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% en el exceso estereomérico sobre otro enantiómero o diaestereoisómero del mismo compuesto.

Métodos de realización de compuestos heterobíclicos de la manifestación

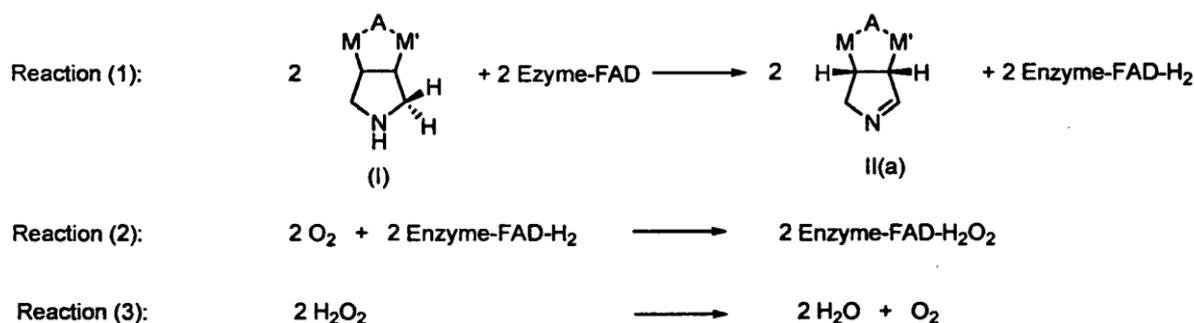
[0250] El compuesto heterobíclico de la manifestación es ensamblado usando procesos biocatalíticos revelados posteriormente, usando la monoaminoxidasas publicadas en la presente como catalizadores biológicos.

ESQUEMA 1



[251] El Esquema 1 representa la reacción catalizada por las monoaminas oxidasas de la divulgación mediante la cual una amina secundaria, es decir, un compuesto heterobíclico según la Fórmula estructural I se oxida a la correspondiente en la línea de compuesto de Fórmula estructural 11(a).

ESQUEMA 2



[0252] El Esquema 2 muestra las tres reacciones elementales que, en conjunto, proporcionan la reacción global neta representada en el Esquema 1. En la primera reacción del Esquema 2, la amina secundaria, un compuesto heterobíclico según la Fórmula estructural I se oxida enantioselectivamente al compuesto imina correspondiente de la Fórmula estructural 11 (a) por una oxidasa de monoamina de la descripción (que está completado con un flavina adenina de nucleótidos co-factor (FAD)) para proporcionar la correspondiente imina sustancialmente enantioméricamente pura de Fórmula estructural II y el complejo FAD de la monoaminoxidasa reducida (Enzima-FAD-H₂). En el segundo paso, la reducción de la monoaminoxidasa (complejo enzima-FAD-H₂) es re-oxidada por oxígeno molecular, produciendo peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como un subproducto. En la tercera reacción (que no está catalizada por la oxidasa monoamina), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se descompone en agua y oxígeno.

[0253] Los sustratos de aminas secundarias de Fórmula estructural I están disponibles comercialmente o se sintetizan fácilmente utilizando métodos y reactivos bien conocidos en la técnica o fácilmente adaptados, a la luz de la presente descripción, a partir de métodos y reactivos conocidos en la técnica (*ver por ej.* Delalu y otros (1999) *J. Heterocyclic Chem.* 36,681; WO 2007/022459; y WO 2007/075790, y las referencias citadas en el mismo).

[0254] El peróxido de hidrógeno es un fuerte agente oxidante capaz de inactivar irreversiblemente la enzima monoaminoxidasa. En consecuencia, en determinadas formas de realización, un componente útil para facilitar la reacción de desproporción se representa en el paso 3 del Esquema 2, arriba, en el que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se descompone en oxígeno molecular y agua. En ciertas formas de realización, ese componente se selecciona de entre agentes químicos, tales como, pero sin limitarse a Pd, Fe, y similares, mientras que en otras formas de realización, el componente es una enzima, tal como la enzima catalasa. En una realización particular, la mezcla de reacción comprende además la enzima catalasa para catalizar la reacción de desproporción de la etapa 3

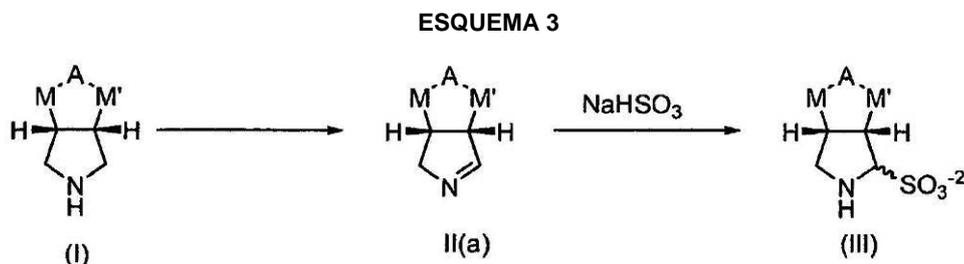
del Esquema 2, en el que dos moléculas del peróxido de hidrógeno se descomponen para proporcionar dos moléculas de agua y una de oxígeno molecular. En formas de realización en particular la catalasa de *Aspergillus niger* es una catalasa que se incluye en la reacción a una concentración de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 1% (w/v), de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,5% (w/v), o desde aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,2% (w/v).

[0255] En aquellos casos en los que el compuesto de Fórmula estructural I es líquido volátil, para facilitar la manipulación se puede proporcionar como una sal. En un aspecto de esta realización, el sustrato de amina se convierte en una sal de acetato mediante la adición de un equivalente de ácido acético a una solución de 10% de la base libre disuelta, por ejemplo, en heptano. Se recoge la sal precipitada, se lava con disolvente (por ejemplo, el disolvente desde el cual se precipita la sal, por ejemplo, heptano) y se seca a temperatura ambiente (aproximadamente 21° C) a presión reducida.

[0256] Como se indica en el **Esquema 1**, el oxidante final es oxígeno molecular. En vista de la limitada solubilidad del oxígeno en agua y a la luz de la disminución en la que la solubilidad como la temperatura y la salinidad (concentración de soluto) aumenta, el oxígeno molecular en solución para la reacción debe ser repuesta por la transferencia de masa gas-líquido a partir de una fase gaseosa. Típicamente, la actividad y la cantidad de monoaminooxidasas preferidas previstas para las tasas de reacción prácticas son suficientes para que la reacción se convierta, limitada por la tasa de transferencia de masa gas-líquido. Como es bien sabido, la tasa de transferencia de masa gas-líquido depende de la presión parcial del gas en el líquido, la solubilidad del gas en el líquido, y el área interfacial de gas-líquido. Dependiendo de la situación, la velocidad de una reacción limitada por la velocidad de transferencia de masa gas-líquido se puede aumentar por entornos de ingeniería que proporcionan una mezcla agresiva de gas-líquido, como por burbujeo, aspiración por hueco de eje de impulsor, circulación en contracorriente de gas-líquido, serpentina de flujo tubular vertical y similares. Adicionalmente, en cualquier entorno de ingeniería, la tasa de un gas-líquido de la reacción limitada por la velocidad de transferencia de masa de oxígeno puede incrementarse mediante el aumento de la presión parcial de oxígeno, ya sea mediante el aumento de la presión total de gas, el aumento de la fracción de oxígeno en el gas (por ejemplo, enriquecer o sustituir aire con oxígeno purificado, de ambos). En realizaciones específicas, la concentración de oxígeno disuelto y/o la tasa de consumo de oxígeno de la fase gaseosa se monitoriza continuamente y la velocidad de alimentación de oxígeno, la presión parcial, la eficiencia del mezclado, o combinaciones de los mismos se ajustan para proporcionar una velocidad de reacción beneficiosa o tiempo de reacción global hasta su finalización.

[0257] En ciertos casos, la mezcla de reacción también puede comprender al menos un agente antiespumante. En una realización particular, el antiespumante es un material comercialmente disponible tal como, pero sin limitarse a Antiespumante-204 o Antiespumante Y-30 (Sigma, St. Louis MO), o similar. En otras formas de realización, la reacción puede comprender más de un antiespumante. El antiespumante puede estar incluido en la reacción a una concentración de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 1% (w/v si es sólido o v/v si un líquido), de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,5%, o de aproximadamente 0,1% a alrededor de 0,2%.

[0258] En ciertos casos, los compuestos de imina oxidados de Fórmula estructural II se pueden aislar de la mezcla de reacción, purificados y caracterizados. En otras formas de realización, descritos a continuación, los compuestos de imina de Fórmula estructural II se pueden convertir a otro aducto o intermedio y utilizarse en una etapa posterior sin aislamiento o purificación.



[0259] En ciertos casos, la monoaminooxidasa de la descripción puede ser inhibida por la imina producto de la Fórmula estructural II. En consecuencia, en realizaciones particulares, la reacción en la que un compuesto de Fórmula estructural I se oxida a un compuesto de Fórmula estructural II comprende además un agente que reaccionará con el compuesto de imina de Fórmula estructural II para formar un aducto con una capacidad reducida o eliminada para inhibir una monoaminooxidasa de la descripción, tal como se representa en el **Esquema 3**. En un aspecto de esta realización, se añade el agente en el comienzo de la reacción o se añade intermitentemente o continuamente en cantidades suficientemente altas para evitar la acumulación de una cantidad inhibitoria del compuesto de imina de Fórmula estructural II, pero lo suficientemente bajo como para evitar la acumulación de una cantidad inhibitoria de enzimas de ese agente. En una forma de realización, el agente es bisulfito de sodio, que puede estar convenientemente suministrado como metabisulfito de sodio, que hidrata en agua a bisulfito de sodio. La reacción de bisulfito con el compuesto imina de Fórmula estructural II proporciona los aductos de sulfito de la Fórmula estructural III. En ciertas formas de realización, se añade

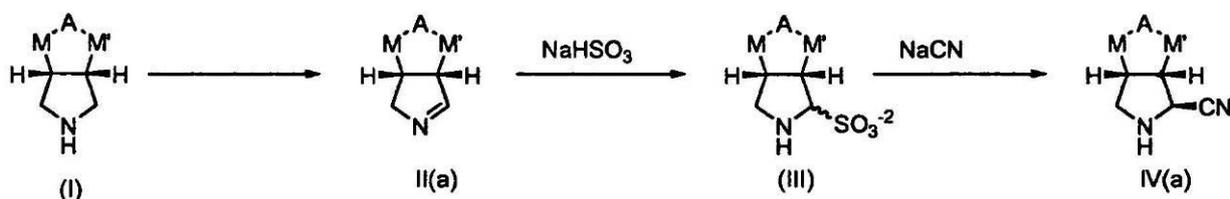
bisulfito de sodio continuamente a la reacción a una velocidad tal que este reactivo se "instantáneamente" consumido y el producto imina potencialmente inhibidor de la Fórmula estructural II quedará "atrapado" como el compuesto aducto menos inhibidor o no inhibidor sulfito de Fórmula estructural III.

5 **[0260]** Ya sea que la monoaminoxidasas inhibida por el producto imina o no, la adición de bisulfito de para hacer reaccionar el producto de imina también proporciona opciones de ingeniería de procesos prácticos. Ciertas iminas son muy volátiles y entre ellos, algunos son malolientes y/o nocivos. Su contención como bases libres requiere reacciones cerradas, sin flujo de gas, o una condensación eficiente de captura química (por ejemplo, mediante una solución de bisulfito). La reacción in situ de sus aductos de bisulfito (los aminosulfonatos), obvia estas limitaciones de ingeniería mientras que también proporciona la opción de llevar a cabo la posterior reacción con cianuro en el mismo recipiente de reacción.

15 **[0261]** La formación del aducto de bisulfito compuesto estructural de Fórmula III se puede revertir a un pH elevado, mediante el cual se regenera la imina correspondiente de la Fórmula estructural II. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la reacción del **Esquema 3** se inactivó mediante la adición de una base, por ejemplo., NaOH 10 N, para elevar el pH a aproximadamente 13, regenerando la imina de Fórmula estructural II que se puede extraer, por ejemplo, con metilo / -butil éter ("MBTE") y, en ciertas realizaciones, aislado por destilación para proporcionar una imina de Fórmula estructural II como un aceite incoloro.

20 **[0262]** En ciertos casos, la tasa de adición del sustrato de la Fórmula estructural I, el agente secuestrante (por ejemplo, bisulfito de sodio), y un agente de control del pH (por ejemplo NaOH) son monitoreados y controlados, en parte, para reducir al mínimo o evitar simultáneamente la inhibición de sustrato y producto de la monoaminoxidasa utilizada como biocatalizador para la conversión de un compuesto de Fórmula estructural I en un compuesto de Fórmula estructural II.

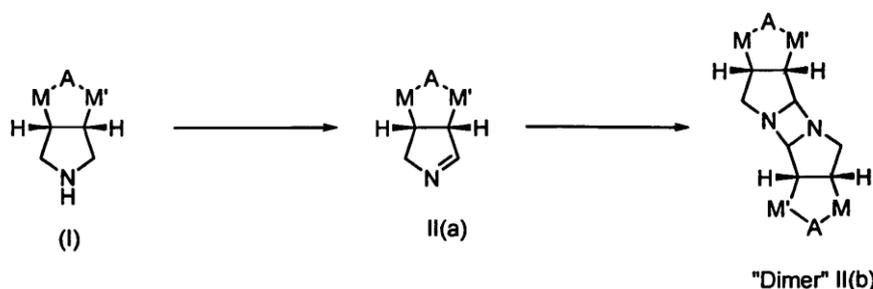
ESQUEMA 4



40 **[0263]** En otra forma de realización, se añade NaCN a la reacción del **Esquema 3** el pH y se permite elevar a alrededor de 10, por lo que los aductos de sulfito de la Fórmula HI estructural estereoselectivamente se convierten en los compuestos de aminonitrilo trans de la Fórmula estructural IV (a), como se ilustra en el Esquema 4. En aspectos de esta realización, se añaden aproximadamente 1 a aproximadamente 3 equivalentes, aproximadamente 1 a aproximadamente 2, aproximadamente 1,05 a aproximadamente 1,5 equivalentes, o alrededor de 1,1 a alrededor de 1,2 equivalentes de NaCN (en relación con el compuesto de imina de la Fórmula estructural II a la reacción para convertir el aductos de sulfito de la IH Fórmula estructural de los compuestos de aminonitrilo trans de la Fórmula estructural IV (a). Adicionalmente, la reacción del compuesto de Fórmula III produce los compuestos de aminonitrilo cis de la Fórmula estructural IV (b).

45 **[0264]** Los compuestos de aminonitrilo trans de la Fórmula estructural IV (a) pueden ser extraídos de la mezcla de reacción (01:01 disolvente orgánico: mezcla de reacción acuosa) usando, por ejemplo, 2-metil tetrahidrofurano, MTBE, o acetato de iso-propilo. El compuesto aminonitrilo trans puede ser recuperado a partir del extracto disolvente orgánico, por ejemplo, el extracto orgánico, con la opción de más aclaraciones intermedias, se puede concentrar a presión reducida para proporcionar los compuestos de aminonitrilo de la Fórmula estructural IV.

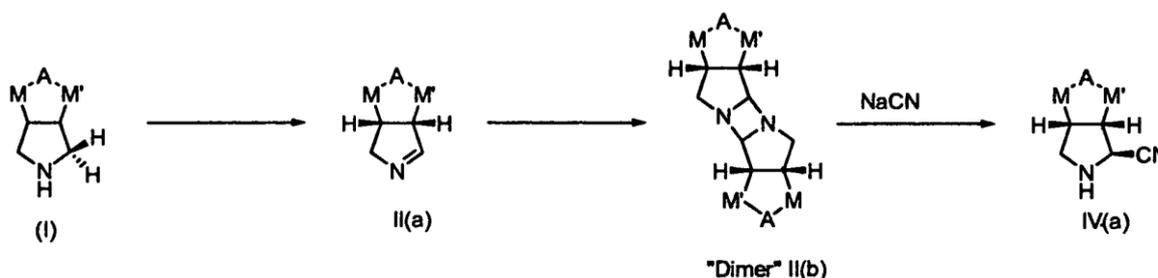
ESQUEMA 5



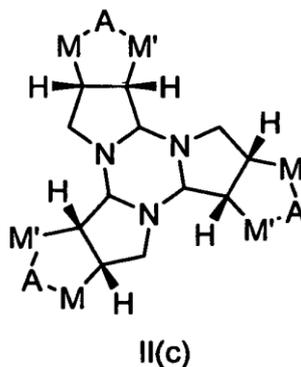
[0265] En ciertos casos, los compuestos de imina de la Fórmula estructural II reaccionan para formar las estructuras

diméricas representadas en el Esquema 5 (véase, por ejemplo. Int. J. Chem. Kinet. 1998,30 (2), 129-136), minimizando o evitando de este modo la inhibición de producto de la monoaminoxidasa de la descripción. Ya sea que la monoaminoxidasa es inhibida por el producto imina o no, la dimerización puede también proporcionar opciones de ingeniería de procesos prácticos. Los dímeros son mucho menos volátiles, en todo caso, que las correspondientes iminas, mitigando sustancialmente la necesidad de ingeniería de contención de iminas volátiles. Por otra parte, los dímeros típicamente pueden ser fácilmente recuperados de la mezcla de reacción por filtración, extracción o destilación por vapor, y por lo general se pueden utilizar directamente en la etapa posterior del proceso. Alternativamente, los dímeros normalmente pueden disolverse en soluciones ácidas a fin de proporcionar soluciones de sal de iminio monoméricas adecuadas para su uso en etapas posteriores para producir los análogos de prolina y derivados bicíclicos deseados.

ESQUEMA 6



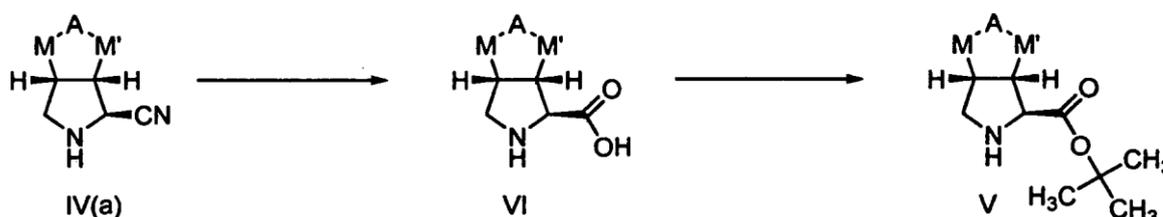
[0266] Es sabido que bajo algunas condiciones las iminas de compuestos monómeros de pirrolidina (por ejemplo, 3,4 - dihidro-2H-pirrol) forman un dímero y trímero y entonces, una estructura termodinámicamente favorable. En consecuencia, ciertos compuestos de Fórmula 11 (a) pueden formar no sólo un dímero sino pasar a formar un trímero (por ejemplo, un compuesto de Fórmula 11 (c) exclusivamente, o alguna mezcla con los compuestos monoméricos y diméricos.



[0267] La favorabilidad de formación de dichos trímeros puede depender de grupos sustituyentes. Sin embargo, se espera que tales compuestos trímeros de Fórmula 11 (c) exhiban poca diferencia en la reactividad en relación con el dímero cuando se utiliza en las reacciones de la presente descripción. Por lo tanto, sin estar obligado por el mecanismo, se espera que los compuestos de Fórmula 11 (a) que se someten a la formación del trímero de Fórmula 11 (c), exhiban reactividad equivalente a la forma del dímero.

[0268] Después de extracción con un disolvente, por ejemplo, MTBE o tolueno, el dímero formado de acuerdo con el Esquema 5 puede contactarse ya sea con NaCN y ácido (por ejemplo, cítrico, acético, o ácido clorhídrico) o con el HCN (a 0° C) a fin de proporcionar los compuestos aminonitrilo trans de la Fórmula estructural IV (a) y los compuestos de aminonitrilo cis de Fórmula IV (b).

ESQUEMA 7

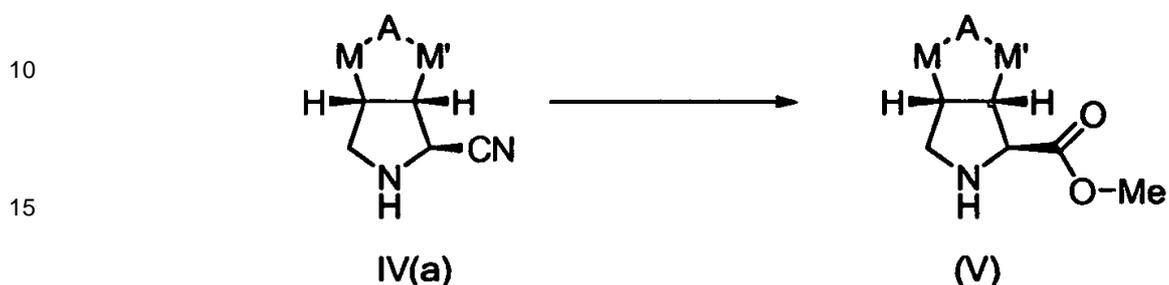


[0269] Los compuestos de aminonitrilo trans de la Fórmula estructural IV (a) preparados, por ejemplo de acuerdo con el Esquema 4 o el Esquema 6 puede ser contactado con un ácido acuoso (por ejemplo, HCl o H₂SO₄) a fin de

proporcionar los aminoácidos de la Fórmula estructural VI. Los ésteres *n*-butilo correspondientes de la Fórmula estructural V, de los cuales el resto R^s es *n*-butyl, se preparan poniendo en contacto los compuestos de amina de la Fórmula estructural VI con un ácido (por ejemplo, ácido metano-sulfónico) y el isobutileno o un éster *n*-butil (por ejemplo, acetato de etilo *n*-butilo), tal como se representa en el **Esquema 7**.

5

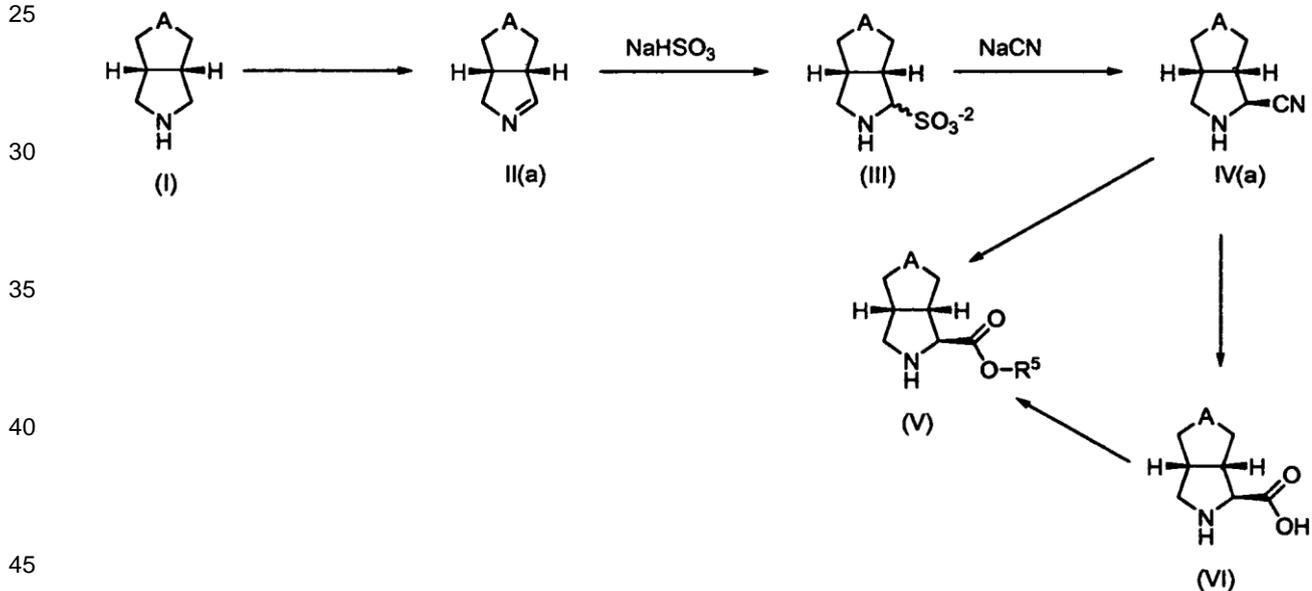
ESQUEMA 8



20 **[0270]** En otro caso, los compuestos de aminonitrilo trans de la Fórmula estructural IV (a) por ejemplo, preparados de acuerdo con el **Esquema 4** o el **Esquema 6** pueden contactarse con HCl y metanol en una reacción de Pinner a fin de proporcionar los ésteres de metilo de la Fórmula estructural V, de los cuales el resto R^s es -CH₃, como se muestra en el **Esquema 8**.

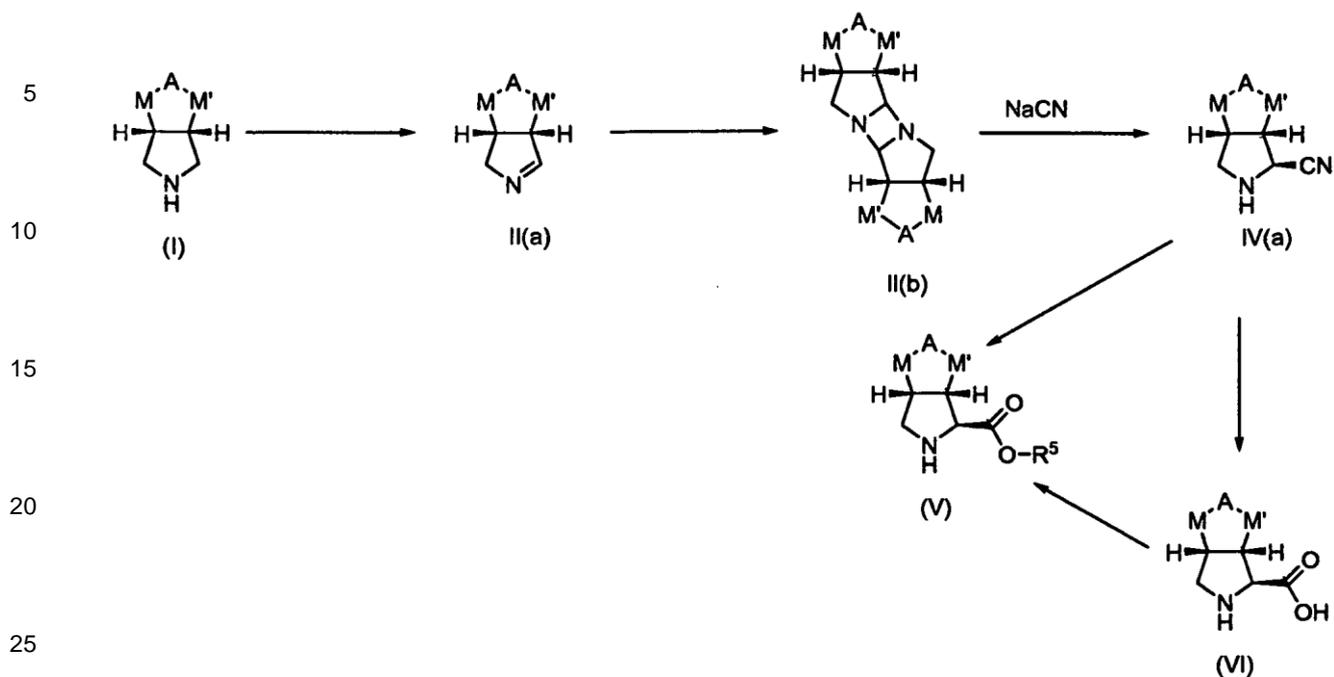
25

ESQUEMA 9



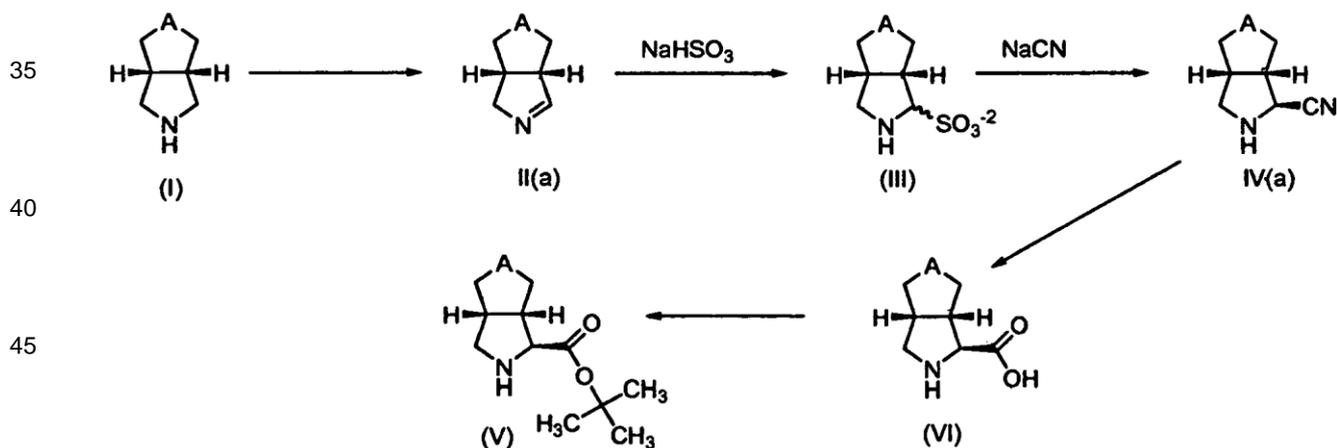
50 **[0271]** El **Esquema 9** representa un proceso general para la preparación de compuestos de acuerdo con las Fórmulas estructurales V y VI a partir de los de aminas secundarias de Fórmula estructural I, en la que el producto de imina de la Fórmula estructural H se mantiene en solución acuosa como el aducto sulfito estructural en la Fórmula III para su conversión en los aminonitrilos de la Fórmula estructural IV.

ESQUEMA 10



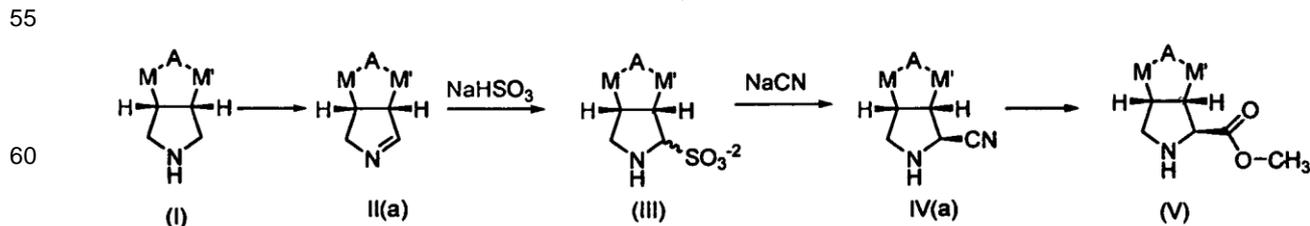
[0272] El Esquema 10 representa un proceso general para la preparación de compuestos de acuerdo con las Fórmulas estructurales V y VI a partir de las aminas secundarias de la Fórmula estructural I, en la que el producto de imina de la Fórmula estructural II (a) se ha dimerizado en el compuesto de la Fórmula estructural II (b) para su conversión en los aminonitrilos de la Fórmula estructural IV (a).

ESQUEMA 11



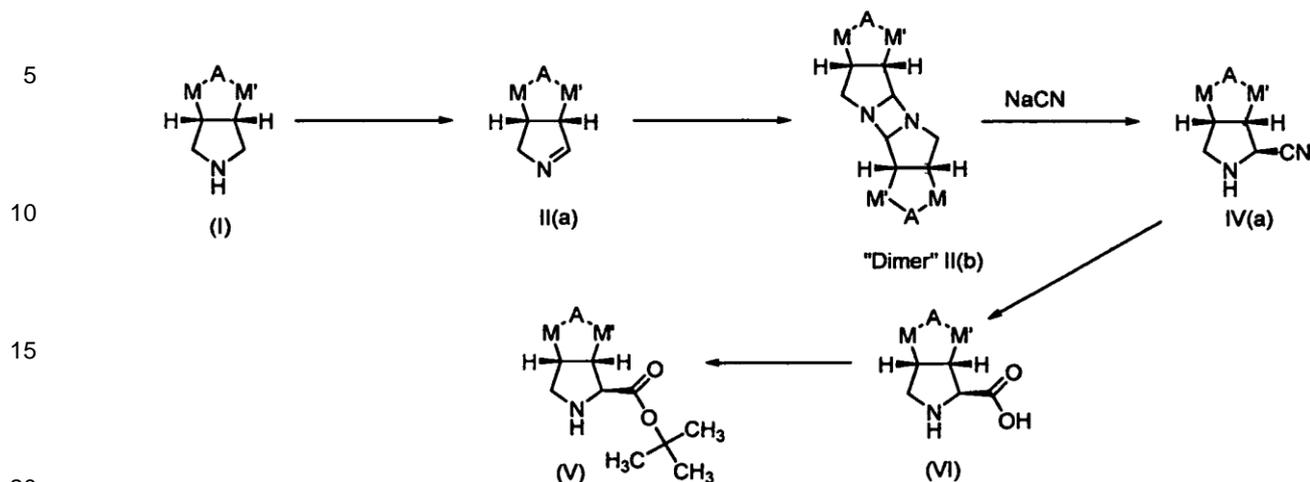
[0273] El Esquema 11 representa un proceso general para la preparación de compuestos según la Fórmula estructural VI y la Fórmula estructural V (de los cuales el resto R es -/butyl) a partir de las aminas secundarias de la Fórmula estructural I que combina las reacciones de los Esquemas 4 y 7.

ESQUEMA 12



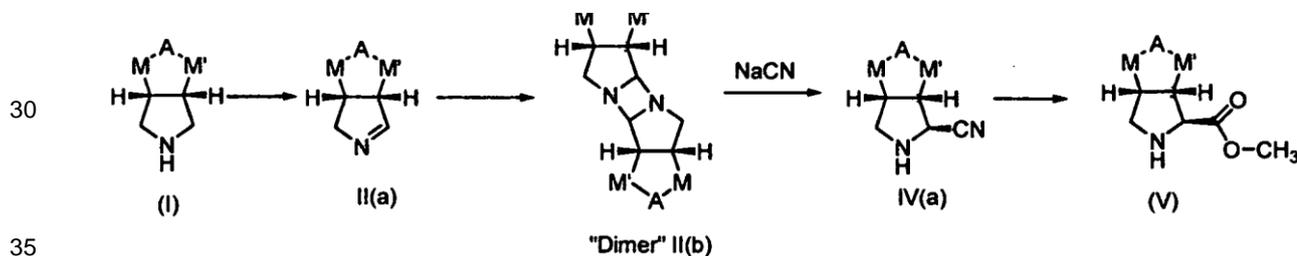
[0274] El esquema 12 representa un proceso general para la preparación de compuestos según la Fórmula estructural V (de los cuales el resto R^s es -CH₃) a partir de las aminas secundarias de la Fórmula estructural I que combina las reacciones de los Esquemas 4 y 8.

ESQUEMA 13



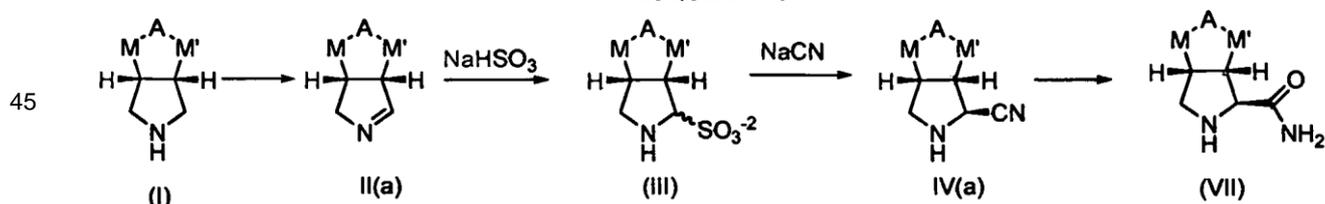
[0275] El Esquema 13 representa un proceso general para la preparación de compuestos según la Fórmula estructural V (de los cuales el resto R^s es -butyl) a partir de las aminas secundarias de la Fórmula estructural I que combina las reacciones de los Esquemas 6 y 7.

25 ESQUEMA 14



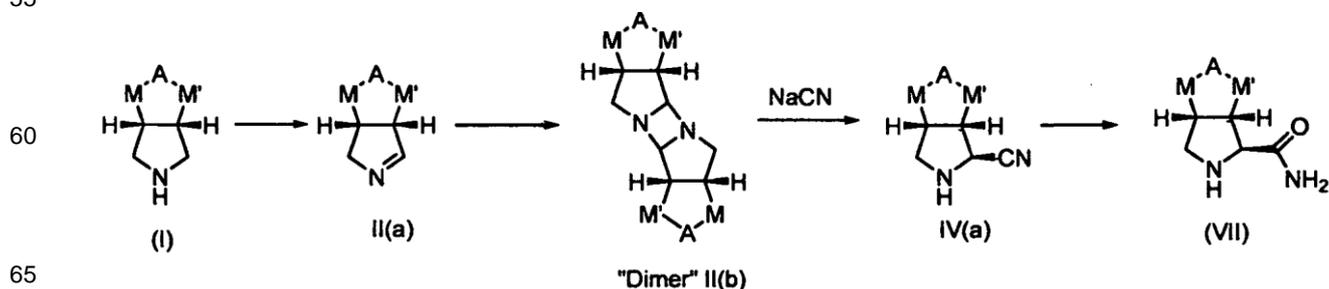
[0276] El Esquema 14 representa un proceso general para la preparación de compuestos según la Fórmula estructural V (de los cuales el resto R^s es -CH₃) a partir de las aminas secundarias de la Fórmula estructural I que combina las reacciones de los Esquemas 6 y 8.

40 ESQUEMA 15



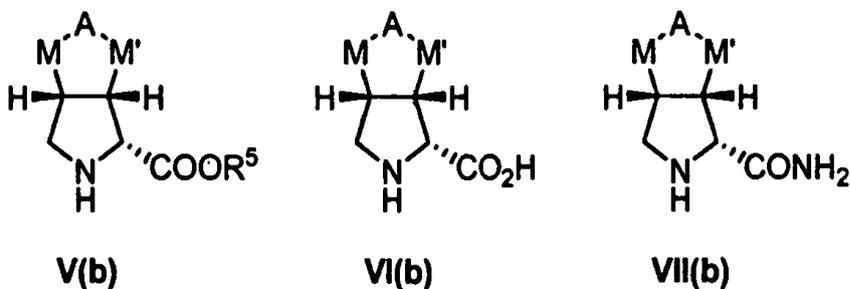
[0277] El Esquema 15 representa un proceso general para la preparación de compuestos según la Fórmula estructural VII a partir de las aminas secundarias de la Fórmula estructural I que incluye las reacciones del Esquema 4.

55 ESQUEMA 16

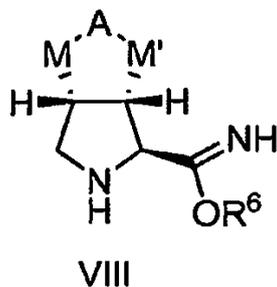


[0278] El **Esquema 16** representa un proceso general para la preparación de compuestos según la Fórmula estructural VII a partir de las aminas secundarias de la Fórmula estructural I que incluye las reacciones del **Esquema 6**.

[0279] En otra forma de realización, cualquiera de los procesos de los **Esquemas 7-16** que implican los compuestos trans-aminonitrilos de la Fórmula IV (a) puede llevarse a cabo con los compuestos cis-aminonitrilos de la Fórmula IV (b). Cuando las reacciones correspondientes a los **Esquemas 7-16** se efectúan utilizando los compuestos cis-aminonitrilos de la Fórmula IV (b), se forman los amino ácidos cis resultantes y las amidas de Fórmulas estructurales V (b), VI (b), y VII (b).



[0280] Sin estar limitado por el mecanismo, se reconoce que se forma un imidato intermedio durante la reacción para formar los compuestos de Fórmulas estructurales V, VI, VII de los **Esquemas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16**. Por consiguiente, en otra realización, la divulgación proporciona un compuesto imidato de Fórmula estructural VIII, en el que R6 es un H o un grupo alquilo.



[0281] Por consiguiente, en algunos casos de los métodos anteriores, un compuesto imidato de Fórmula estructural VIII se puede utilizar en la preparación de un compuesto de Fórmula estructural V, VI, y VII.

Enzimas de Monoaminoxidasa

[0282] La presente publicación brinda enzimas de monoaminoxidasa manipuladas genéticamente que son capaces de oxidar estereoselectivamente o convertir el sustrato, un compuesto estructural de Fórmula I en un compuesto estructural de Fórmula II. En casos particulares, la presente publicación brinda enzimas de monoaminoxidasa manipuladas genéticamente que son capaces de oxidar estereoselectivamente o convertir el sustrato, compuesto (1) en compuesto (2). En otros casos, la presente publicación brinda enzimas de monoaminoxidasa manipuladas genéticamente que son capaces de oxidar estereoselectivamente o convertir el sustrato, compuesto (3) en compuesto (4). En ambas instancias, una monoaminoxidasa de la presente publicación también exhibirá una propiedad mejorada al ser comparada con la monoaminoxidasa de *Aspergillus niger* (SEC NRO:2), silvestre, de origen natural o *Aspergillus oryzae* (SEC NRO:32), o un híbrido del mismo (SEC NRO:6) o al ser comparada con otra enzima de monoaminoxidasa manipulada genéticamente (*la del* SEC NRO:8). Las propiedades de las enzimas para las que se desea una mejora incluyen, pero no se limitan a, la actividad enzimática, la estabilidad térmica, el perfil de actividad del pH, los requerimientos del cofactor, la refractariedad a los inhibidores (por ejemplo, la inhibición del producto), la estereoespecificidad, la estereoselectividad, la estabilidad de la solvencia, la solubilidad, y la estabilidad y nivel de expresión dentro de una célula huésped. Las mejoras se pueden referir a una sola propiedad de la enzima, tal como la actividad enzimática, o una combinación de distintas propiedades enzimáticas, tales como la actividad enzimática y la estereoselectividad.

[0283] La secuencia del polinucleótido que codifica la monoaminoxidasa de origen natural del *Aspergillus niger* y del *Aspergillus oryzae*, y por lo tanto las correspondientes secuencias aminoácidas, están disponibles en el no. de ingreso de Genbank L38858 para *Aspergillus niger*, y no. de ingreso de Genbank XM OO 1822832 para *Aspergillus oryzae*.

[0284] En algunos casos, las monoaminoxidasas aquí descritas pueden tener un número de modificaciones a

la secuencia de referencia (por ejemplo, *polipéptidos de origen natural*, o un polipéptido manipulado genéticamente) que resultarán en una propiedad de monoaminoxidasa mejorada. En tales casos, el número de modificaciones de la secuencia aminoácida puede abarcar uno o más aminoácidos, 2 o más aminoácidos, 3 o más aminoácidos, 4 o más aminoácidos, 5 o más aminoácidos, 6 o más aminoácidos, 8 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos, o 20 o más aminoácidos, hasta el 10% del número total de aminoácidos, hasta el 20% del número total de aminoácidos, o hasta el 30% del número total de aminoácidos de la secuencia de referencia. En algunos casos, el número de modificaciones del polipéptido de origen natural o un polipéptido manipulado genéticamente que produce una propiedad de monoaminoxidasa mejorada puede abarcar desde alrededor de 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-21, 1-22, 1-23, 1-24, 1-25, o cerca de 1-30 modificaciones a la secuencia de referencia, o combinaciones del mismo.

[0285] En algunos casos, las modificaciones abarcan sustituciones aminoácidas de la secuencia de referencia. Las sustituciones que pueden producir una propiedad mejorada de monoaminoxidasa pueden ser en 1 más aminoácidos, 2 o más aminoácidos, 3 o más aminoácidos, 4 o más aminoácidos, 5 o más aminoácidos, 6 o más aminoácidos, 8 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos, o 20 o más aminoácidos, hasta el 10% del número total de aminoácidos, hasta el 20% del número total de aminoácidos, o hasta el 30% del número total de aminoácidos de la secuencia de la enzima de referencia. En tales casos, el número de sustituciones al polipéptido de origen natural o un polipéptido manipulado genéticamente que produce una propiedad de monoaminoxidasa mejorada puede abarcar desde alrededor de 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-21, 1-22, 1-23, 1-24, 1-25, o cerca de 1-30 sustituciones aminoácidas de la secuencia de la enzima de referencia.

[0286] En algunos casos, una propiedad mejorada, al ser comparada con un polipéptido silvestre u otro manipulado genéticamente, de la monoaminoxidasa, es con respecto a un aumento en su estereoselectividad, es decir, aquí, un aumento en el exceso estereomérico del producto, para la oxidación de un compuesto de Fórmula estructural I a un compuesto de Fórmula estructural II, o en casos particulares, la oxidación o conversión del compuesto (1) al compuesto (2), o la oxidación del compuesto (3) al compuesto (4). En algunos casos, una propiedad mejorada de la monoaminoxidasa, es con respecto a un aumento en su habilidad de convertir o reducir un mayor porcentaje del sustrato al producto. En algunos casos, una propiedad mejorada de la monoaminoxidasa, es con respecto a un aumento en su proporción de conversión del sustrato al producto. Esta mejora en su actividad enzimática puede manifestarse en la habilidad de utilizar menos monoaminoxidasa mejorada en comparación con la silvestre u otra secuencia de referencia al oxidar o convertir la misma cantidad de producto. En algunos casos, una propiedad mejorada, de la monoaminoxidasa, es con respecto a su estabilidad o estabilidad térmica. En algunos casos, la monoaminoxidasa tiene más de una propiedad mejorada.

[0287] En algunos casos, la monoaminoxidasa de la publicación es capaz de convertir el sustrato (IR,5S)-6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexano, compuesto (1) a (IR,5S)-6,6-dimetil-3-azabicyclo[3.1.0]hex-2-ene, compuesto (2), con un porcentaje de exceso estereomérico de al menos cerca del 95% y en un porcentaje mejorado sobre un polipéptido de referencia que tiene la secuencia aminoácida del SEC NRO.: 2, SEC NRO.:32 o SEC NRO.: 6. Los polipéptidos ejemplares con tales propiedades incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que abarcan una secuencia aminoácida que corresponde al SEC NRO.:4, 8 y 10.

[0288] En algunos casos, la monoaminoxidasa de la publicación es capaz de convertir el sustrato (3aR,6aS)-octahidrociclopenta[c]pirrol, compuesto (3) a (3aS,6aR)-1.3a,4,5,6,6a-hexahidrociclopenta[c]pirrol, compuesto (4), con un porcentaje de exceso estereomérico de al menos cerca del 95% y en un porcentaje mejorado sobre un polipéptido de referencia que tiene la secuencia aminoácida del SEC NRO.: 2, SEC NRO.:32 o SEC NRO.: 6. Los polipéptidos ejemplares con tales propiedades incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que abarcan una secuencia aminoácida que corresponde al SEC NRO.: 10, 14, 16, 18, 20, y 36.

[0289] Los cuadros 2 y 3, a continuación brindan una lista de los SEC NRO aquí publicados con actividades asociadas. Las secuencias que aparecen a continuación están basadas en las secuencias de monoaminoxidasa de tipo *Aspergillus niger* silvestre (SEC NRO: 1 y 2) a menos que se especifique lo contrario. En los cuadros 2 y 3 a continuación cada fila enumera dos SEC NRO, donde el número impar se refiere a la secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoácida provista por el número par. La columna que enumera el número de mutaciones (es decir, cambios residuales) se refiere al número de sustituciones aminoácidas, comparadas con la secuencia aminoácida de la monoaminoxidasa de tipo *Aspergillus niger* silvestre del SEC NRO: 1 y 2. A cada cuadro le sigue un subtítulo que indica el significado de los símbolos “+” “++” “+++” en cada contexto.

Tabla 2: Listas de Secuencias y su Correspondiente Mejora en su Actividad con Respecto a la Conversión del Compuesto (1) a (2):

SEC NRO	Número de Cambios del <i>A. niger</i> (SEC NRO:2)	Activity ^a	% ee ^b
3/4	2	+	+++
7/8	3	+++	+++
9/10	64	++++	+++
11/12	65	+ + + + + + +	+ + +

^a Actividad: + = 0-100%; ++ = 100-300%; +++ = 300-500%;
++++ = 500-1000%; +++++ = 1000-1500%; ++++++ = 1500-2000% de la actividad de la monoaminoxidasa diseñada de *A. niger* (SEC NRO:2) con respecto a la conversión del compuesto (1) al compuesto (2).
^b. Enantioselectividad: +++ = 99-100% de exceso enantiomérico

Tabla 3: Listas de Secuencias y su Correspondiente Mejora en su Actividad con Respecto a la Conversión del Compuesto (3) a (4):

SEC NRO	Número de Cambios del <i>A. niger</i> (SEC NRO:2)	Activity ^a	% ee ^b
9/10	64	+	+++
13/14	65	++	+++
15/16	66	+++	+++
17/18	67	++++	+++
19/20	68	++++	+++
35/36	67	++	+++

^a. Actividad: + = 0-100%; ++ = 100-300%; +++ = 300-500%;
++++ = 500-1000%; de la actividad de la monoaminoxidasa diseñada de *A. niger* (SEC NRO:8) con respecto a la conversión del compuesto (3) al compuesto (4). La monoamino oxidase de tipo *A. niger* silvestre no tuvo un nivel de actividad detectable en el sustrato, compuesto (3).
^b. Enantioselectividad: +++ = 99-100% de exceso enantiomérico

[0290] En algunos casos, una monoaminoxidasa de la publicación abarca una secuencia aminoácida que es al menos cerca de un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica en comparación a una secuencia de referencia que abarca la secuencia del SEC NRO: 2 con la condición de que el polipéptido abarque una secuencia aminoácida en la que el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 289 sea una valina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 348 sea una glutamina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 382 sea una leucina, y el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 465 sea una glicina. En algunos casos, estas monoaminoxidasas pueden tener una o más modificaciones en la secuencia aminoácida de SEC NRO: 12. Las modificaciones pueden incluir sustituciones, supresiones, e inserciones. Las sustituciones pueden ser sustituciones no conservadoras,

sustituciones conservadoras, o una combinación de sustituciones conservadoras y no conservadoras.

[0291] En algunos casos, una monoaminoxidasa de la publicación abarca una secuencia aminoácida que es al menos cerca de un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica en comparación a una secuencia de referencia que abarca la secuencia del SEC NRO: 2 con la condición de que el polipéptido abarque una secuencia aminoácida en la que el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 289 sea una valina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 348 sea una glutamina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 365 sea un triptófano, y el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 465 sea una glicina. En algunos casos, estas monoaminoxidasas pueden tener una o más modificaciones en la secuencia aminoácida de SEC NRO: 14. Las modificaciones pueden incluir sustituciones, supresiones, e inserciones. Las sustituciones pueden ser sustituciones no conservadoras, sustituciones conservadoras, o una combinación de sustituciones conservadoras y no conservadoras.

[0292] En algunos casos, una monoaminoxidasa de la publicación abarca una secuencia aminoácida que es al menos cerca de un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica en comparación a una secuencia de referencia que abarca la secuencia del SEC NRO: 2 con la condición de que el polipéptido abarque una secuencia aminoácida en la que el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 99 sea un ácido glutámico, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 289 sea una valina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 348 sea una glutamina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 365 sea un triptófano, y el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 465 sea una glicina. En algunos casos, estas monoaminoxidasas pueden tener una o más modificaciones en la secuencia aminoácida de SEC NRO: 16. Las modificaciones pueden incluir sustituciones, supresiones, e inserciones. Las sustituciones pueden ser sustituciones no conservadoras, sustituciones conservadoras, o una combinación de sustituciones conservadoras y no conservadoras.

[0293] En algunos casos, una monoaminoxidasa de la publicación abarca una secuencia aminoácida que es al menos cerca de un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica en comparación a una secuencia de referencia que abarca la secuencia del SEC NRO: 2 con la condición de que el polipéptido abarque una secuencia aminoácida en la que el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 99 sea un ácido glutámico, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 135 sea una glutamina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 289 sea una valina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 348 sea una glutamina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 365 sea un triptófano, y el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 465 sea una glicina. En algunos casos, estas monoaminoxidasas pueden tener una o más modificaciones en la secuencia aminoácida de SEC NRO: 18. Las modificaciones pueden incluir sustituciones, supresiones, e inserciones. Las sustituciones pueden ser sustituciones no conservadoras, sustituciones conservadoras, o una combinación de sustituciones conservadoras y no conservadoras.

[0294] En algunos casos, una monoaminoxidasa de la publicación abarca una secuencia aminoácida que es al menos cerca de un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica en comparación a una secuencia de referencia que abarca la secuencia del SEC NRO: 2 con la condición de que el polipéptido abarque una secuencia aminoácida en la que el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 99 sea un ácido glutámico, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 135 sea una glutamina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 284 sea ácido aspártico, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 289 sea una valina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 348 sea una glutamina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 356 sea una valina, el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 365 sea un triptófano, y el residuo aminoácido correspondiente a la posición residual 465 sea una glicina. En algunos casos, estas monoaminoxidasas pueden tener una o más modificaciones en la secuencia aminoácida de SEC NRO: 20. Las modificaciones pueden incluir sustituciones, supresiones, e inserciones. Las sustituciones pueden ser sustituciones no conservadoras, sustituciones conservadoras, o una combinación de sustituciones conservadoras y no conservadoras.

[0295] En algunos casos, una monoaminoxidasa mejorada abarca una secuencia aminoácida que es al menos cerca de un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica en comparación a una secuencia de referencia que abarca la secuencia del SEC NRO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, o 36, como se enumera en los cuadros 2 y 3, donde una secuencia aminoácida mejorada de amino oxidasa incluye cualquier set de las combinaciones de sustituciones aminoácidas especificadas presentadas en las secuencias aminoácidas de los Cuadros 2 y 3. En algunos casos, estas monoaminoxidasas pueden tener adicionalmente de entre 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, o 1-20 mutaciones en otros residuos aminoácidos. Las mutaciones pueden abarcar inserciones, supresiones, o sustituciones, o combinaciones de las mismas. En algunos casos, las mutaciones adicionales abarcan sustituciones conservadoras.

[0296] Como puede apreciarse por el experto en la técnica, los polipéptidos aquí descritos no se restringen a los aminoácidos codificados genéticamente. Además de los aminoácidos codificados genéticamente, los polipéptidos aquí descritos pueden abarcar, ya sea de manera total o en parte aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos sintéticos sin codificación. Ciertos aminoácidos sintéticos sin codificación comúnmente encontrados

los cuales las monoaminooxidasas aquí descritas puedan abarcar incluyen, pero no se limitan a: los estereómeros D de los aminoácidos codificados genéticamente; 2.3-ácido diaminopropiónico (Dpr); α -ácido aminoisobutírico (Aib); ϵ -ácido aminohexanoico (Aha); δ -ácido aminoaléico (Ava); N-metilglicina o sarcosina (MeGly o Sar); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (Bua); t-butilglicina (Bug); N-metilisoleucina (Melle); fenilglicina (Phg); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle); naftilalanina (Nal); 2-chlorofenilalanina (Ocf); 3-chlorofenilalanina (Mcf); 4-chlorofenilalanina (Pcf); 2-fluorfenilalanina (Off); 3-fluorfenilalanina (Mff); 4-fluorfenilalanina (Pff); 2-bromofenilalanina (Obf); 3-bromofenilalanina (Mbf); 4-bromofenilalanina (Pbf); 2-metilfenilalanina (Omf); 3-metilfenilalanina (Mmf); 4-metilfenilalanina (Pmf); 2-nitrofenilalanina (Onf); 3-nitrofenilalanina (Mnf); 4-nitrofenilalanina (Pnf); 2-cianofenilalanina (Ocf); 3-cianofenilalanina (Mcf); 4-cianofenilalanina (Pcf); 2-trifluorometilfenilalanina (Otf); 3-trifluorometilfenilalanina (Mtf); 4-trifluorometilfenilalanina (Ptf); 4-aminofenilalanina (Paf); 4-iodofenilalanina (Pif); 4-aminometilfenilalanina (Pamf); 2.4-diclorofenilalanina (Opef); 3.4-diclorofenilalanina (Mpcf); 2.4-difluorfenilalanina (Opff); 3.4-difluorfenilalanina (Mpf); pirid-2-ilalanina (2pAla); pirid-2-ilalanina (3pAla); pirid-2-ilalanina (4pAla); naft-1-ilalanina (1nAla); naft-2-ilalanina (2nAla); tiazolilalanina (taAla); benzotienilalanina (bAla); tienilalanina (tAla); furilalanina (fAla); homofenilalanina (hPhe); homotirosina (hTyr); homotriptófano (hTrp); pentafluorfenilalanina (5ff); estirilalanina (sAla); autrilalanina (aAla); 3.3-difenilalanina (Dfa); ácido 3-amino-5-fenipentanoico (Afp); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic); P-2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (Mso); N(w)-nitroarginina (nArg); homolisina (hLys); fosfometilfenilalanina (pmPhe); fosfoserina (pSer); fosfotreonina (pThr); ácido homoaspártico (hAsp); ácido homoglutámico (hGlu); ácido l-aminociclopenta-(2 o 3)-ene-4-carboxílico; ácido piperídico (PA), ácido azetidina-3-carboxílico (ACA); ácido 1-aminociclopentano-3-carboxílico; alilglicina (aOly); propargilglicina (pgGly); homoalanina (hAla); norvalina (nVal); homoleucina (hLeu), homovalina (hVal); homoisoleucina (hIle); homoarginina (hArg); N-acetil lisina (AcLys); ácido 2.4-diaminobutírico (Dbu); ácido 2.3-diaminobutírico (Dab); N-metilvalina (MeVal); homocisteína (hCys); homoserina (hSer); hidroxiprolina (Hyp) y homoprolina (hPro). Los aminoácidos adicionales sin codificación que las monoaminooxidasas descritas en este documento puedan abarcar serán evidentes para los expertos en la técnica. (*ver, por ejemplo*, los diversos aminoácidos provistos en Fasman, 1989, CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, (Manual Práctico de Bioquímica y Química Molecular) CRC Press, Boca Ratón, FL, en las págs. 3-70 y las referencias allí citadas. Estos aminoácidos pueden estar en la configuración L o D.

[0297] Los expertos en la técnica podrán reconocer que las monoaminooxidasas aquí especificadas pueden también abarcar aminoácidos o residuos que llevan grupos protectores de las cadenas laterales. Ejemplos no limitantes de tales aminoácidos protegidos, los cuales en este caso pertenecen a la categoría aromática, incluyen (grupos protectores enumerados en paréntesis), pero no se limitan a: Arg (tos), Cys (metilbencilo), Cys (nitropiridinasulfenil), Glu(δ -benzilester), Gln(xantilo), Asn(N- δ -xantilo), His(bom), His(bencilo), His(tos), Lys(fmoc), Lys(tos), Scr(O-bencilo), Thr (O-bencilo) and Tyr(O-bencilo).

[0298] Los aminoácidos sin codificación que son restringidos conformacionalmente que las monoaminooxidasas aquí descritas puedan componer incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos N-metilo (configuración L); ácido 1-aminociclopenta-(2 o 3)-ene-4-carboxílico; ácido piperídico acid; ácido azetidíno-3-carboxílico; homoprolina (hPro); y ácido l-aminociclopentano-3-carboxílico.

[0299] Como se describe arriba las diversas modificaciones introducidas a los polipéptidos de origen natural para generar una monoamino oxidase manipulada genéticamente pueden ser dirigidas a una propiedad específica de la enzima.

45

Polinucleótidos que Codifican Monoaminooxidasas Manipuladas Genéticamente

[0300] En otro aspecto, la presente publicación brinda polinucleótidos que codifican monoaminooxidasas manipuladas genéticamente aquí especificadas. Los polinucleótidos pueden funcionar vinculados a una o más secuencias heterólogas regulatorias que controlan la expresión genética para crear un polinucleótido recombinante capaz de expresar el polipéptido. Las construcciones de expresión que contienen un polinucleótido heterólogo que codifica la monoaminooxidasas manipulada genéticamente pueden ser introducidas en las células huésped apropiadas para expresar el correspondiente polipéptido de monoaminooxidasas.

[0301] Debido al conocimiento de los codones que corresponde a los diversos aminoácidos, la disponibilidad de una secuencia de proteína brinda una descripción de todos los polinucleótidos capaces de codificar el caso. La degeneración del código genético, donde los mismos aminoácidos son codificados por codones alternativos o sinónimos permite realizar un número extremadamente grande de ácidos nucleicos, los cuales en su totalidad codifican la monoaminooxidasas aquí especificada. Así, habiendo identificado una secuencia aminoácida en particular, los expertos en la técnica podrían realizar cualquier número de diferentes ácidos nucleicos, simplemente modificando la secuencia de uno o más codones sin alterar la secuencia de la proteína. En este sentido, la presente publicación específicamente contempla todas y cada una de las variaciones posibles de polinucleótidos que pudieran realizarse al seleccionar combinaciones basadas en las posibles opciones de codones, y todas estas variaciones deberán ser consideradas descritas específicamente para cualquier polipéptido aquí especificado, incluso las secuencias aminoácidas presentadas en los Cuadros 2 y 3.

65

- 5 **[0302]** En algunos casos, el polinucleótido abarca una secuencia nucleótida que codifica una monoaminooxidasa con una secuencia aminoácida que tiene al menos alrededor de 80% o más identidades de secuencia, alrededor de 90% o más identidades de secuencia, alrededor de 95% o más identidades de secuencia, alrededor de 96% o más identidades de secuencia, alrededor de 97% o más identidades de secuencia, alrededor de 98% o más identidades de secuencia, o 99% o más identidades de secuencia para cualquiera de las monoaminooxidasas de referencia manipuladas genéticamente aquí descritas. En algunos casos, los polinucleótidos codifican una monoaminooxidasa manipulada genéticamente que abarca una secuencia aminoácida seleccionada de los SEC NRO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, o 36.
- 10 **[0303]** En algunos casos, los codones se seleccionan preferentemente para ajustarse a la célula huésped en la que se produce la proteína. Por ejemplo, los codones de preferencia utilizados en bacterias se utilizan para expresar el gen en bacterias; los codones de preferencia utilizados en la levadura se utilizan para expresar el gen en la levadura; y los codones de preferencia utilizados en mamíferos se utilizan para expresar el gen en células de mamíferos. A modo de ejemplo, el polinucleótido de SEC NRO: 1 ha sido optimizado en su codón para su expresión en *E. coli*, pero por lo demás codifica la monoaminooxidasa del *Aspergillus niger* origen natural.
- 15 **[0304]** En algunos casos, todos los codones necesitan ser reemplazados para optimizar el uso del codón de la monoaminooxidasa ya que la secuencia natural abarcará los codones de preferencia y debido a que el uso de los codones de preferencia puede no requerirse para todos los residuos aminoácidos. En consecuencia, los polinucleótidos con codones optimizados que codifican las monoaminooxidasas pueden contener codones de preferencia al 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o más del 90% de las posiciones de codones de la región de codificación en toda su longitud.
- 20 **[0305]** En algunos casos, los polinucleótidos que codifican una monoaminooxidasa manipulada genéticamente se seleccionan de entre los SEC NRO: 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, o 35. En algunos casos, los polinucleótidos son capaces de hibridar bajo condiciones altamente estrictas a un polinucleótido que abarca los SEC NRO: 5 o 31, donde el polinucleótido capaz de hibridar bajo condiciones altamente estrictas codifica una monoaminooxidasa funcional.
- 25 **[0306]** En otros casos, los polinucleótidos abarcan polinucleótidos que codifican la monoaminooxidasa aquí descrita pero tienen alrededor de 80% o más identidades de secuencia, alrededor de 85% o más identidades de secuencia, alrededor de 90% o más identidades de secuencia, alrededor de 95% o más identidades de secuencia, alrededor de 98% o más identidades de secuencia, o 99% o más identidades de secuencia a nivel nucleótido con un polinucleótido de referencia que codifica una monoaminooxidasa manipulada genéticamente.
- 30 En algunos casos, el polinucleótido de referencia se selecciona de las secuencias de polinucleótidos representadas por los SEC NRO: 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, o 35.
- 35 **[0307]** Un polinucleótido aislado que codifica una monoaminooxidasa mejorada puede ser manipulado de varias maneras para expresar el polipéptido. La manipulación del polinucleótido aislado previa a su inserción a un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar los polinucleótidos y secuencias ácido nucleicas utilizando métodos de ADN recombinante son reconocidas en la materia. Se brinda guía en Sambrook y otros, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. (Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory Press; y *Current Protocols in Molecular Biology*, (Protocolos Actuales en Biología Molecular) Ausubel. F.ed., Greene Pub. Associates, 1998, actualizaciones al 2006.
- 40 **[0308]** Para las células huésped bacterianas, los promotores adecuados que dirigen la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente publicación, incluyen los promotores obtenidos del operón lac *E. coli*, el gen de agarasa *Streptomyces coelicolor* (dagA), el gen levansucrasa *Bacillus subtilis* (sacB), el gen alfa-amilasa *Bacillus licheniformis* (amyL), el gen de amilasa maltogénica *Bacillus stearothermophilus* (amyM), el gen alfa-amilasa *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), del gen penicilinasa *Bacillus licheniformis* (penP), de los genes *Bacillus subtilis* xylA y xylB, y el gen procariota lactamasa beta (Villa-Kamaroff y otros, 1978, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 75: 3727-3731), así como el promotor *tac* (DeBoer y otros, 1983, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 80: 21-25). Se describen otros promotores en "Proteínas útiles de bacterias recombinantes" en *Scientific American*, 1980, 242:74-94; y en Sambrook y otros, *supra*.
- 45 **[0309]** Para las células huésped filamentosas fungales, los promotores adecuados que dirigen la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente publicación, incluyen los promotores obtenidos de los genes para la amilasa *Aspergillus oryzae* TAKA, la proteinasa aspártica *Rhizomucor miehei*, la amilasa alfa neutral *Aspergillus niger*, la amilasa alfa estable de los ácidos *Aspergillus niger*, la glucoamilasa *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (glaA), la lipase *Rhizomucor miehei*, la proteinasa alcalina *Aspergillus oryzae*, la isomerasa de fosfato de triosa *Aspergillus oryzae*, la acetamidasa *Aspergillus nidulans*, y la proteinasa de tipo tripsina *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), así como el NA2-tpi promotor (un híbrido de los promotores de genes para la amilasa alfa neutral *Aspergillus niger* e isomerasa de fosfato de triosa *Aspergillus oryzae*), y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.
- 60
- 65

[0310] En una célula de levadura, los promotores útiles pueden ser de genes para la enolasa *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), la galactoquinasa *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), el alcohol dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP), y la 3-fosfoglicerato quinasa *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para las células huésped de levadura se describen en Romanos y otros, 1992, *Yeast* 8:423-488.

[0311] La secuencia de control también puede ser una secuencia apropiada de terminador de la transcripción, una secuencia reconocida por la célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia de terminación está unida operacionalmente al plazo de 3' de la secuencia del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped elegida puede ser utilizada en los métodos aquí descritos.

[0312] Por ejemplo, los terminadores de transcripción ejemplares para las células huésped filamentosas fungales pueden obtenerse de los genes para la amilasa *Aspergillus oryzae* TAKA, la glucoamilasa *Aspergillus niger*, la antranilato sintasa *Aspergillus nidulans*, la glucosidasa alfa *Aspergillus niger*, y la proteasa de tipo tripsina *Fusarium oxysporum*.

[0313] Los terminadores ejemplares para células de levadura pueden obtenerse de los genes para la enolasa *Saccharomyces cerevisiae*, el citocromo C *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1), y el gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para las células huésped de levadura se describen en Romanos y otros, 1992, supra.

[0314] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder apropiada, una región no trasladada de un mRNA que es importante para el traslado hecho por la célula huésped. La secuencia líder está unida operacionalmente al plazo de 5' de la secuencia del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped elegida puede ser utilizada. Los líderes ejemplares para las células huésped filamentosas fungales pueden obtenerse de los genes para la amilasa *Aspergillus oryzae* TAKA y la isomerasa de fosfato de triosa *Aspergillus nidulans*. Los líderes apropiados para la enolasa *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), la 3-fosfoglicerato quinasa *Saccharomyces cerevisiae* factor alfa, y el alcohol dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

[0315] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia unida operacionalmente al plazo de 3' de la secuencia del ácido nucleico y la cual, al ser transcrita, es reconocida por la célula huésped como una señal para agregar residuos de poliadenosina al mRNA transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped elegida puede ser utilizada en los métodos aquí descritos. Las secuencias de poliadenilación ejemplares para las células huésped filamentosas fungales pueden obtenerse de los genes para la amilasa *Aspergillus oryzae* TAKA, la glucoamilasa *Aspergillus niger*, la antranilato sintasa *Aspergillus nidulans*, la proteasa de tipo tripsina *Fusarium oxysporum*, y la glucosidasa alfa *Aspergillus niger*. Las secuencias de poliadenilación útiles para las células huésped de levadura se describen en Guo and Sherman, 1995, *Mol Cell Bio* 15:5983-5990.

[0316] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido de señal que codifica para una secuencia aminoácida unida al amino terminal de un polipéptido y dirige al polipéptido codificado hacia el camino de secreción de la célula. El término de 5' de la secuencia de codificación de la secuencia del ácido nucleico puede contener inherentemente una región codificante del péptido de señal naturalmente unida en el marco de lectura del traslado con el segmento de la región codificante que codifica el polipéptido secretado. Alternativamente, el término de 5' de la secuencia de codificación puede contener una región codificante del péptido de señal que sea extraña a la secuencia codificante. La región codificante del péptido de señal extraña puede requerirse donde la secuencia codificante no contenga naturalmente una región codificante del péptido de señal.

[0317] Alternativamente, la región codificante del péptido de señal extraña puede simplemente reemplazar a la región codificante del péptido de señal natural con el fin de mejorar la secreción del polipéptido. Sin embargo, cualquier región codificante del péptido de señal que dirija al polipéptido expresado hacia el camino de secreción de la célula huésped elegida puede ser utilizada en los métodos aquí descritos.

[0318] Las regiones codificantes del péptido de señal efectivas para células huésped bacterianas son las regiones codificantes del péptido de señal obtenidas de los genes para la amilasa maltogénica *Bacillus* NC1B 11837 maltogenic amylase, la amilasa alfa *Bacillus stearothermophilus*, la subtilicina *Bacillus licheniformis*, la beta lactamasa *Bacillus licheniformis*, las proteasas neutrales *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM), y *Bacillus subtilis* prsA. Más péptidos de señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, *Microbiol Rev* 57: 109-137.

[0319] Las regiones codificantes del péptido de señal efectivas para las células huésped filamentosas fungales pueden ser las regiones codificantes del péptido de señal obtenidas de los genes para la amilasa *Aspergillus oryzae* TAKA, la amilasa neutral *Aspergillus niger*, la glucoamilasa *Aspergillus niger*, la proteinasa aspártica *Rhizomucor miehei*, la celulasa *Humicola insolens*, y la lipasa *Humicola lanuginosa*.

[0320] Los péptidos de señal útiles para células huésped de levadura pueden ser de los genes para factor alfa *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa *Saccharomyces cerevisiae*. Otras regiones codificantes del péptido útiles se describen en Romanos y otros, 1992, supra.

[0321] La secuencia de control también puede ser una región codificante del propéptido que codifica para una secuencia aminoácida ubicada en la terminal amino de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y puede ser convertido en un propolipéptido activo maduro mediante una escisión catalítica o autocatalítica del propéptido desde el propolipéptido. La región codificante propéptida puede obtenerse de los genes para la proteasa alcalina *Bacillus Subtilis* (aprE), la proteasa neutral *Bacillus Subtilis*(nprT), el factor alfa *Saccharomyces cerevisiae*, la proteinasa aspártica *Rhizomucor miehei*, y la lactosa *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0322] Donde ambas regiones péptidas y propéptida están presentes en la terminal amino de un polipéptido, la región del propéptido se ubica junto a la terminal amino de un polipéptido y la región de señal del péptido se ubica junto a la terminal amino de la región del propéptido.

[0323] A su vez, también es conveniente agregar secuencias reguladoras, que permiten la regulación de expresión del polipéptido en relación con el crecimiento de la célula huésped. Ejemplos del sistema regulador son aquellos que conducen la expresión del gen al activarse o apagarse en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Un sistema regulador adecuado en células huésped procarionta incluye los sistemas de operaciones *lac*, *tac* y *trp*. En células huésped de levadura, un sistema regulador adecuado puede incluir ejemplos como el sistema ADH1 o GAL1. En hongos filamentosos, secuencias reguladoras aceptables incluyen el promotor TAKA alfa-amilasa, el promotor de glucoamilasa *Apergillus Níger*, y el promotor de glucoamilasa *Aspergillus oryzae*.

[0324] Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación del gen. En sistemas eucariota, éstos incluyen el gen dihidrofolato reductasa, que es amplificado en la presencia de metotrexato, y de genes metalotioneínas, que son amplificados con metales pesados. En estos casos, la secuencia de ácido nucleico que codifica las monoaminooxidasas aquí especificadas podría ser operativamente vinculada con la secuencia reguladora.

[0325] Así, en otro caso, la presente publicación está también dirigida a un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido configurando una monoaminooxidasa desarrollada o una variante de la misma, y una o más expresiones regulando regiones tales como un promotor y un terminador, una réplica de origen, etc., dependiendo del tipo de huéspedes en los que estén siendo introducidos. Los ácidos nucleicos al igual que las secuencias de control descritas arriba pueden unirse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir una o más situaciones de restricciones convenientes que permitirán inserción o sustitución de la secuencia del ácido nucleico que configura el polipéptido en tal situación. Alternativamente, la secuencia de ácido nucleico de la presente publicación puede ser expresada al insertar la secuencia de ácido nucleico o en una construcción del ácido nucleico que comprende la secuencia en un vector de expresión apropiado. Al crear el vector de expresión, la secuencia de codificación se coloca en el vector para que la secuencia de codificación sea operativamente vinculada con el apropiado control de secuencias para expresión.

[0326] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (ejemplo, un plásmido o un virus), que puede ser convenientemente sometido a un proceso recombinante de ADN y que puede traer la expresión de una secuencia de polinucleótido. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en donde el vector es introducido. Los vectores puede ser lineares o plásmidos circulares cerrados.

[0327] El vector de expresión puede ser un vector autónomo replicado, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la réplica que es independiente de la replicación cromosómica, ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un mini cromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede hacerse de cualquier medio para asegurar una auto replica. Alternativamente, el vector puede ser el que, al momento de ser introducido dentro de la célula huésped, se integre dentro del genoma y se replique junto con los cromosomas en los que ya ha sido integrado. Además, un solo vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen un total de ADN para ser introducidos en el genoma de una célula huésped o en un transposón, puede ser utilizado.

[0328] El vector de expresión de la presente publicación preferentemente contiene uno o más indicadores elegibles, que permiten la selección sencilla de células transformadas. Un indicador elegible es un gen el producto del cual provee para biocidas o resistencia viral, resistencia a metales pesados, prototrofos a auxótrofos, y similares. Ejemplos de indicadores elegibles bacteriales son los genes *dal* de Bacillus, subtiliso Bacillus licheniformis, o indicadores, que puedan otorgar resistencia antibiótica como la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol (Ejemplo 1) o tetraciclina. Indicadores aceptables para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3.

[0329] Indicadores elegibles para uso en células huésped de un hongo filamentoso incluyen, pero no están limitadas a, amdS(acetamida), OTC(ornitina transcarbamilasa), bar (fosfotricina acetiltransferasa) hph(higromicina fosfotransferasa), niaD(nitrato reductasa), pyrG(orotidina- 5- fosfato decarboxilasa), sC(sulfato adenyltransferase), y trpC(antranilato sintasa), al igual que equivalentes del mismo. Realizaciones de uso en una célula *Aspergillus* incluye el amdS y pyrG genes de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen bar de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0330] Los vectores de expresión de la presente publicación preferentemente contienen un elemento(s) que permite la integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma. Para integración en el genoma de la célula huésped, el vector debe guiarse por la secuencia de ácido nucleico codificando el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para integración del vector en el genoma por recombinación homóloga o no-homóloga.

[0331] Alternativamente, el vector de expresión puede contener secuencias de ácido nucleico adicionales para dirigir la integración de recombinación homóloga en la célula huésped del genoma. Las secuencias adicionales de ácido nucleico le permiten al vector ser integrado en el genoma de la célula huésped en un lugar específico en el cromosoma. Para aumenta la posibilidad de integración es un lugar específico, la integración de elementos debe contener preferentemente suficientes cantidad de ácido nucleico, tal como 100 a 10,000 pares base, preferentemente 400 a 10,000 pares base, y más preferentemente 800 a 10,000 pares base, que son sumamente homólogos con el objetivo de secuencia correspondiente para aumentar la probabilidad de recombinaciones homólogas. Los elementos de integración pueden encontrarse en cualquier secuencia que homóloga con el objetivo de secuencia en el genoma de la célula huésped. Además, la integración de elementos puede ser no-codificable o codificable de secuencias de ácidos nucleicos. Por otro lado, el vector puede ser integrado en el genoma de la célula huésped por recombinaciones no-homólogas.

[0332] Para replicación autónoma, el vector puede además comprender un origen de replicación permitiendo al vector replicarse autónomamente en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de orígenes bacteriales de replicación son P15A ori (como se muestra en el plásmido de la figura 5) o los orígenes de replicación de plásmidos Pbr322, pUC19, pACYC177, pE194, pTA1060, o pAM.beta.l permitiendo replicación en el Bacillus. Ejemplos de orígenes de replicación para utilizar en una célula huésped de levadura son los 2 micrones orígenes de replicación, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6. El origen de replicación puede llegar a contener mutación lo que genera funcionamiento sensible de la temperatura en la célula huésped (ver, *ejemplo.*, Ehrlich, 1978, *Proc Natl Acad Sci. USA* 75:1433)

[0333] Más de una copia de secuencia de ácido nucleico en la presente publicación puede ser insertada en la célula huésped para incrementar la producción del producto de gen. Un aumento en el número de copia de la secuencia del ácido nucleico puede obtenerse al integrar al menos una copia adicional de secuencias en el genoma de la célula huésped o al incluir un gen indicador elegible amplificador con la secuencia del ácido nucleico donde las células contienen copias amplificadas del indicador elegible del gen, y por lo tanto copias adicionales de la secuencia de ácido nucleico, pueden seleccionarse para cultivar las células en la presencia de un apropiado agente elegible.

[0334] Muchos vectores de expresión utilizados en los métodos descritos en la publicación están disponibles a nivel comercial. Expresiones comerciales apropiadas incluyen p3xFLAGTM vectores de expresión de Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis MO., que incluye el promotor CMV y hGH poliadenilación que corresponde a la expresión de células huéspedes mamíferas y pBR322 origen de indicadores de resistencia de replicación y ampicilina para la amplificación de *E. coli*. Otros vectores de expresión adecuados son pBluescriptII SK(-) y pBK-CMV, los cuales están disponibles a nivel comercial en Stratagene, Lajolla CA, y plásmidos que son derivados de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pREP4, pCEP4 (Invitrogen) o pPoly (Lathe "y otros", 1987, *Gene* 57:193-201).

Células huésped para la expresión de la monoaminoxidasas.

[0335] Por otro lado, la presente publicación provee una célula huésped que comprende un polinucleótido codificando una monoaminoxidasa mejorada en la presente publicación, el polinucleótido ha sido vinculado operativamente a una o más secuencias de control para expresión de la monoaminoxidasa en la célula huésped. Las células huéspedes son utilizadas en expresar la monoaminoxidasa, polipéptidos codificados por el vector de expresión de la presente publicación son sumamente conocidos en el arte e incluyen pero no es limitados a células bacteriales, como *E. coli*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus minor*, *Streptomyces* y células de *Salmonella typhimurium*; células de hongos, tal como células de levadura (ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (ATCC Accesoión No. 201178)); células de insectos tal como *Drosophila* S2 y células *Spodoptera* Sf9; células animales tales como CHO, COS, BHK, 293 y células melanoma Bowes, y células vegetales. Son bien conocidos dentro del área de estudios medios de cultivo apropiados para las células huéspedes descritos en éste párrafo.

[0336] Polinucleótido para expresar la monoaminoxidasa puede ser introducido en células por medio de varios métodos conocidos en el arte. Algunas técnicas entre otras incluyen, electroporación, método biolístico, lipofección, transfección de cloruro de calcio, y fusión de protoplastos. Varios métodos para introducir polinucleótidos en las

células van a ser aparentes para el artesano.

[0337] Un ejemplo de célula huésped es *Escherichia coli* W3110. El vector de expresión fue creado al vincular operativamente un polinucleótido configurando una monoaminoxidasa mejorada en el plásmido pCKI 10900 operativamente vinculado al promotor *lac* bajo control del represor *lacI*. El vector de expresión también contiene el origen de replicación Pl5a y el gen de resistencia cloranfenicol. Las células que contienen el sujeto polinucleótido en *Escherichia coli* W3110 fueron aisladas al direccionar las células hacia la selección de cloranfenicol.

Los métodos de generación de monoaminoxidasas desarrolladas.

[0338] En algunos casos, para hacer la monoaminoxidasa polinucleótido y polipéptidos de la presente publicación, la monoaminoxidasa natural que cataliza la reacción de óxido es obtenida (o derivada) de *Aspergillus Níger* o *Aspergillus oryzae*. En algunos casos, la secuencia padre polinucleótido es optimizada para mejorar la expresión de la monoaminoxidasa en una célula huésped. De modo ilustrativo, la secuencia padre polinucleótido que codifica el tipo rustico del polipéptido monoaminoxidasa de *Aspergillus niger* fue construida de oligonucleótidos preparados en base a la conocida secuencia de aminoácido de *Aspergillus Níger* secuencia de monoaminoxidasa disponible en la base de datos Genbank (Genbank accesión no. L38858). La secuencia polinucleótido padre, designada como SEC NRO: 1, fue optimizada para expresión en *E. coli* y clonada y optimizada polinucleótido en un vector de expresión, colocando la expresión del gen de monoaminoxidasa bajo el control del promotor *lac* y el gen represor *lacI*. Clones expresando la monoaminoxidasa activa en *E. coli* fueron identificados, al igual que los genes en forma de secuencia confirmaron su identidad. La secuencia designada (SEC NRO: 2) fue la secuencia padre utilizada como el punto de partida para la mayor parte de experimentos y construcción de biblioteca de monoaminoxidasas desarrolladas que evolucionaron de la monoaminoxidasa *Aspergillus niger*.

[0339] La monoaminoxidasa desarrollada puede obtenerse al someter el polinucleótido codificando el proceso natural de la monoaminoxidasa a mutagénesis y o métodos de evolución asistida, como se explayó más arriba. Un ejemplo de una técnica de evolución asistida es mutagénesis y o arrastramiento de ADN así descrito en Stemmer, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10747-10751; WO 95/22625. WO 97/0078; WO 97/27230; WO 00/42651; WO 01/75767 y U.S. Pat. 6, 537,746. Otros procedimientos de evolución asistida que pueden ser utilizados incluyen, entre otros, proceso de extensión escalonada (StEP), recombinación *in Vitro* (Zhao, y otros, 1998, *Nat. Biotechnol.* 16; 258-261), mutagenética PCR (Caldwell, y otros, 1994, *PCR Methods Appl.* 3:S136-S140), y casetes mutagénesis (Black, y otros, 1996, *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3523-3529).

[0340] Los clones obtenidos siguiendo el tratamiento de mutagénesis son proyectados para el desarrollo de monoaminoxidasa teniendo una propiedad de enzimas deseada. Se puede utilizar técnicas de bioquímica para medir la actividad de la enzima, tales como, pero no limitado a la actividad de Monoaminoxidasa que puede ser medida utilizando métodos publicados o adaptaciones de los mismos, para medir monoaminoxidasa, tal como, pero no limitado a aquellos publicados por Zhou "y otros" (Zhou "y otros" "A One- Step Fluorometric Methos for the Continuous Measurement of Monoamine Oxidase Activity," 1997 *Anal. Biochem.* 253: 168-74) 7 Szutowicz "y otros" (Szutowicz "y otros", "Colorimetric Assay for Monoamine Oxidase in Tisúes Using Peroxidase and 2, 2 - Azino (3-ethy Ibenzthiazoline-6-sulfonic Acid) as Chromogen," 1984, *Anal. Biochem.* 138:86-94). Algunas comparaciones de la actividad de la enzima se hacen utilizando una preparación definida de enzima, un ensayo químico bajo condiciones propuestas, y uno o más sustratos definidos, descrito adicionalmente en detalle aquí o utilizando los métodos de, ejemplo, Zhou y Szutowicz. Generalmente, cuando las células lisis son comparadas, los números de células y la cantidad de la proteína examinada son determinadas también como uso de un sistema idéntico de expresión y células huésped idénticas para minimizar variaciones en la cantidad de enzima producida por las células huéspedes y presentes en la lisis. En el momento en que se alcanza la estabilidad termal deseada de la enzima mejorada, la actividad de enzima puede ser medida luego de someter las preparaciones de la enzima a una temperatura específica y al medir la cantidad de actividad de la enzima restante luego de exponerla al calor. Clones que contienen un polinucleótido que están codificando una monoaminoxidasa son luego aislados, secuenciados para identificar los cambios de la secuencia de los nucleótidos (si hay), para luego utilizarlos para expresar la enzima en una célula huésped.

[0341] Donde se conoce la secuencia de polipéptidos desarrollados, los polinucleótidos que codifican la enzima pueden ser preparados por métodos estándar de fase-sólida, de acuerdo con ya conocidos métodos sintéticos. En algunos casos, fragmentos de hasta 100 bases pueden ser individualmente sintetizados, luego unidos (ejemplo, por distintos métodos de enzimas o químicos, o métodos de polimerasa mediada) para formar una secuencia continua deseada. Por ejemplo, polinucleótidos y oligonucleótidos mencionados en ésta publicación pueden ser preparados por síntesis químicas usando, ejemplo, el clásico método fosforamidita descrito por Beaucage "y otros", 1981, *Tet Lett* 22:1859-69, o el método descrito por Matthes "y otros", 1984, *EMBO J.* 3:801-05, ejemplo, como es típicamente practicado en métodos sintéticos automatizados. De acuerdo con el método fosforamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, ejemplo, en un sintetizador automático purificado, recocido, ligado y clonado en vectores apropiados. Además, esencialmente cualquier ácido nucleico puede obtenerse de cualquier variedad de fuente comercial, tales como The Midland Certified Reagent Company, Midland, TX, The Great American Gene Company, Ramona, CA, ExpressGen Inc. Chicago, IL, Operon Technologies Inc., Alameda, CA, entre otras.

[0342] Monoaminooxidasas desarrolladas expresadas en una célula huésped pueden ser recuperadas de las células o del medio de cultivo usando una o más técnicas conocidas para la purificación de proteínas, incluyendo, entre otras, el uso de lisozima, sonicación, filtración, salificación, ultra-centrifugación, y cromatografía. Soluciones adecuadas para lisina y la alta eficiencia en extracción de proteínas de bacterias, tales como *E. coli*, están disponibles bajo el nombre comercial CellLytic B TM de Sigma-Aldrich en St. Louis MO.

[0343] Las técnicas de cromatografía para el aislamiento de monoaminooxidasa incluyen, entre otras, cromatografía de fase reversa, cromatografía líquida de gran desempeño, cromatografía de intercambio de ion, electroforesis en gel, y cromatografía de afinidad. Las condiciones para purificar una enzima en particular dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, de la hidrofobicidad, del peso molecular, de la forma molecular, etc., y será aparente para aquellos con habilidad en el arte de ésta ciencia.

[0344] En algunos casos, técnicas de afinidad pueden ser utilizados para aislar la monoaminooxidasa mejorada. Para cromatografía purificada, cualquier anticuerpo que específicamente una la monoaminooxidasa, puede ser utilizado. Para la producción de anticuerpos, varios animales huéspedes, incluyendo, pero no sólo limitando a este, conejos, lauchas, ratas, etc., pueden ser inmunizados por medio de inyección con un compuesto. El compuesto puede estar adjunto a un portador aceptable, tal como BSA, por medio de un grupo aparte funcional de cadena o enlaces adjuntos a otro grupo o cadena funcional. Varios adyuvantes pueden usarse para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie del huésped, incluyendo pero no limitando a Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas en la superficie tales como lisolecticina, polioles plurónicos, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potenciales tales como BCG (bacilli Calmette Guerin) y *Corynebacterium parvum*

Métodos de uso de las monoaminooxidasas desarrolladas y compuestos preparados con ellas.

[0345] La monoaminooxidasa aquí descrita puede catalizar la oxidación de un sustrato compuesto de una Formula I estructural a un estereoisómero producto de la Formula estructural II (a):



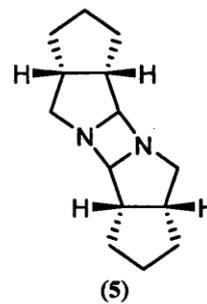
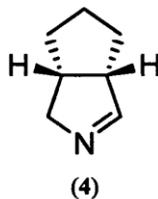
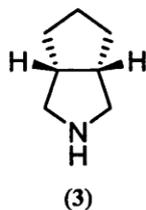
[0346] En el cual casa A, M, y M' son descriptas de la forma arriba ilustradas.

[0347] En un caso en particular, la monoaminooxidasa aquí descrita puede catalizar la oxidación del sustrato (1R, 5S)-6, 6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano, compuesto (1) al producto estereoisómero, (1R, 5S)-6, 6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hex-2-ano, compuesto (2):



[0348] En algunos casos de este método para oxidante de sustrato, compuesto (1) a el producto, compuesto (2), la monoaminooxidasa polipéptido, como ha sido comparada ya al tipo silvestre *A. niger* secuencia de SEC NRO: 2, debe tener al menos las siguientes substituciones de aminoácidos: (1) residuo 465 es glicina, (2) residuo 289 es valina, (3) residuo 384 es glutamina, y (4) residuo 382 es leucina.

[0349] En otro caso particular, la monoaminooxidasa aquí descrita cataliza la oxidación del sustrato (3aR, 6 aS) – octahidrociclopenta [c] pirrol, compuesto (3) al producto estereoisómero, (3aS, 6aR)- 1, 3 a, 4,5,6,6 a-hexahidrociclopenta [c] pirrol, compuesto (4), el cual además puede someterse a dimerización para formar el compuesto (5):

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

[0350] En un caso de este método de sustrato oxidante, compuesto (3) a el producto, compuesto (4), la monoaminoxidasa polipéptido, como fue comparada con el tipo silvestre *A. niger* secuencia de SEC NRO:1, debe tener al menos uno de los siguientes sustituto de aminoácidos: (1) residuo 465 es glicina, (2) residuo 289 es valina, (3) residuo 384 es glutamina, y (4) residuo 365 triptófano. En otro caso de este método para reducir el sustrato, compuesto (3) del producto, compuesto (4), la monoaminoxidasa polipéptido, tal como fue comparada con su tipo silvestre *A. niger* secuencia de SEC NRO:1, debe tener al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácido: (1) residuo 465 es glicina, (2) residuo 289 es valina, (3) residuo 384 es glutamina, y (4) residuo 365 triptófano, (5) residuo 99 es ácido glutámico, y (4) residuo 135es glutamina. Además en otro caso, la monoaminoxidasa tal como fue comparada con su tipo silvestre *A. niger* secuencia de SEC NRO:1, debe tener al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácido: (1) residuo 465 es glicina, (2) residuo 289 es valina, (3) residuo 99 es ácido glutámico y (4) residuo 135es glutamina y o residuo 248 es ácido aspártico.

[0351] En un caso de este método para oxidar el sustrato al producto, el sustrato es oxidado al producto en un exceso estereométrico mayor a 99%, donde la monoaminoxidasa comprende una secuencia que corresponde a SEC NRO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 O 20.

[0352] En otro caso de este método para la reducción de sustrato al producto, al menos cerca del 50% del sustrato es convertido al producto en menos de 24 horas cuando se lleva a cabo con más de aproximadamente 25g/L de sustrato y menos de aproximadamente 5g/L del polipéptido, donde el polipéptido contiene una secuencia de aminoácido correspondiente a SEC NRO: 4,8,10,12,14,16,18, o 20.

[0353] En otros casos, cualquiera de las monoaminoxidasas previstas aquí pueden utilizarse en la producción de intermediarios para la síntesis de Schering 505034 ((1R, 2S, 5S)- N-(4-amino-1-ciclobutilo-3,4-dioxobutan-yl)-3-((S)-2-(3-tert-butylureido)-3, 3- dimetilbutano)-6, 6-dimetil-3-azabicyclo[3.1.0] hexano-2-carboxamida), un inhibidor proteasa útil para el tratamiento de infecciones virales (Malcolm, y otros, (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(3): 1013-20). Un paso importante en la síntesis de Schering 505034 es la conversión de un compuesto de estructura de Formula I al compuesto estructural de la Formula II, o más específicamente, compuesto (1) a compuesto (2). Entonces, la presente publicación provee métodos para la producción de Schering 505034, los métodos comprenden el paso de convertir el compuesto (1) a compuesto (2) usando una monoaminoxidasa polipéptido de la publicación. Métodos publicados aquí para la producción de Schering 505034 también pueden incluir uno o más de los pasos representados y descritos en conexión con los **esquemas 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12 y 14** antes mencionados.

[0354] En otros casos, cualquiera de las monoaminoxidasas previstas aquí pueden utilizarse en la producción de intermediarios para la síntesis de VX-950 ((N-((S)-1- ciclohexilo 1-2-((S)-1-((S,3aR, 6aS)-1-((R)- 3-(2-(ciclopropilamino)-2-oxoacetilo) hexanoilo)hexadidrociclopenta [c] pirrol-2(1H)-yl)-3,3-dimetil-1-oxobutano-2-ilamino)-2-oxoethyl)pyrazine-2-carboxamide, un inhibidor proteasa útil para el tratamiento de infecciones virales (*Perni, y otros, (2006) Antimicrob. Agent Chemother.* 50 (3): 899-909). Un paso importante en la síntesis de VX-950 es la conversión de un compuesto de estructura de Formula I al compuesto estructural de la Formula II, o más específicamente, compuesto (3) a compuesto (4) Entonces, la presente publicación provee métodos para la producción de VX-950, los métodos comprenden el paso de convertir el compuesto (3) a compuesto (4) usando una monoaminoxidasa polipéptido de la publicación. Métodos publicados aquí para la producción de VX-950 también pueden incluir uno o más de los pasos representados y descritos en conexión con los **esquemas 3,4,5,6,7,9,10,11 y 13** antes mencionados.

[0355] Como es sabido por los expertos en la técnica, las reacciones de oxidasa monoaminoxidasa catalizadas por lo general requieren un cofactor. Las reacciones de oxidación catalizadas por las monoaminoxidasas descritas en este documento típicamente requieren también un cofactor, la flavina-adenina nucleótidos (FAD). Tal como se utiliza en este documento, el término "cofactor" se refiere a un compuesto no proteico que opera en combinación con un inhibidor de la monoamina. Generalmente, se añade la forma oxidada del cofactor, que puede ser no-covalentemente o covalentemente unido a la oxidasa monoamina, a la mezcla de reacción. La forma FAD oxidada puede ser regenerada a partir de la forma reducida FAD-H2 por oxígeno molecular. En otras formas de realización, la forma oxidada FAD podría ser regenerada por el NAD (P) para proporcionar FAD y NAD (P) H. El NAD (P) podría, a su vez, ser regenerada por reducción de una cetona a un alcohol usando un (NADP) H de alcohol-deshidrogenasa

dependiente / cetona reductasa.

[0356] Las reacciones de oxidación catalizadas por monoaminoxidasa descritas en este documento se llevan a cabo generalmente en un disolvente. Los disolventes adecuados incluyen agua, disolventes orgánicos (por ejemplo, acetato de etilo, acetato de butilo, 1-octanol, heptano, octano, éter metil t-butílico (MTBE), tolueno, y similares), y líquidos iónicos (por ejemplo, 1-etil 4 -metilimidazolio tetrafluoroborato, 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato, hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio, y similares). En algunas formas de realización, se utilizan disolventes acuosos, incluyendo el agua y los sistemas de co-disolventes acuosos.

[0357] Los sistemas de co-disolventes acuosos de ejemplo tienen agua y uno o más disolventes orgánicos. En general, un componente de disolvente orgánico de un sistema de co-disolvente acuoso se selecciona de tal manera que no inactiva completamente la enzima monoaminoxidasa. Los sistemas de co-disolvente apropiados pueden ser fácilmente identificados mediante la medición de la actividad enzimática de la enzima monoaminoxidasa especificada con un sustrato de interés definida en el sistema disolvente candidato, utilizando un ensayo de actividad enzimática, tales como los descritos en este documento.

[0358] El componente disolvente orgánico de un sistema de co-disolvente acuoso puede ser miscible con el componente acuoso, proporcionando una única fase líquida, o puede ser parcialmente miscible o inmiscible con el componente acuoso, proporcionando dos fases líquidas. En general, cuando se emplea un sistema de co-disolvente acuoso, que se selecciona para ser bifásica, con agua dispersa en un disolvente orgánico, o viceversa. En general, cuando se utiliza un sistema de co-disolvente acuoso, es deseable seleccionar un disolvente orgánico que pueda ser fácilmente separado de la fase acuosa. En general, la relación de agua a disolvente orgánico en el sistema de co-disolvente está típicamente en el rango de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 10:90 (v / v) de disolvente orgánico a agua, y entre 80:20 y 20: 80 (v / v) de disolvente orgánico a agua. El sistema de co-disolvente puede ser pre-formado previo a la adición a la mezcla de reacción, o puede ser formado in situ en el recipiente de reacción.

[0359] El (agua o sistema de co-disolvente acuoso) disolvente acuoso puede ser de pH de solución o sin una solución. En general, la oxidación se puede llevar a cabo a un pH de alrededor de 10 o inferior, usualmente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10. En algunas formas de realización, la oxidación se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 9 o inferior, usualmente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 9. En algunas formas de realización, la oxidación se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 8 o inferior, a menudo en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y por lo general en el rango de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. La oxidación también puede llevarse a cabo a un pH de aproximadamente 7,8 o inferior, o 7,5 o inferior. Alternativamente, la oxidación se puede llevar a cabo un pH neutro, es decir, alrededor de 7.

[0360] Durante el transcurso de las reacciones de oxidación, el pH de la mezcla de reacción puede cambiar. Las aminas típicas de la fórmula estructural I son protonadas con un pH aproximadamente neutro, mientras que los productos de imina de fórmula estructural II son típicamente no protonadas y en un pH aproximadamente neutro. En consecuencia, en formas de realización típicas donde la reacción se realiza a o aproximadamente pH neutro, la oxidación de la amina protonada a la imina protonada no libera un protón en la solución acuosa. El pH de la mezcla de reacción puede mantenerse a un pH deseado o dentro de un intervalo de pH deseado mediante la adición de una base durante el curso de la reacción. Alternativamente, el pH puede ser controlado mediante el uso de un disolvente acuoso que comprende una solución. Las soluciones adecuadas para mantener los intervalos de pH deseados se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, solución de fosfato, solución de trietanolamina, y similares. También se pueden utilizar las combinaciones de soluciones o de adición de base.

[0361] Las bases adecuadas para la neutralización de ácido son bases orgánicas, por ejemplo aminas, alcóxidos y similares, y bases inorgánicas, por ejemplo, sales de hidróxido (por ejemplo, NaOH), sales de carbonato (por ejemplo, NaHCO₃), sales de bicarbonato (por ejemplo, K₂CO₃), sales básicas de fosfato (por ejemplo, K₂HPO₄, Na₃PO₄), y similares. Una base preferida para los protones liberados neutralizantes de la oxidación de la amina a la imina en el transcurso de la reacción es el propio sustrato amina. La adición de una base de concurrente con el transcurso de la conversión se puede realizar de forma manual mientras se monitoriza el pH de la mezcla de reacción o, más convenientemente, mediante el uso de un titulador automático como un pH-stato. una combinación de la capacidad de soluciones parcial y adición de base También se puede utilizar para el control de proceso. Típicamente, las bases añadidas a mezclas de reacción solucionadas o parcialmente solucionadas en el transcurso de la oxidación se agregan en soluciones acuosas.

[0362] Al llevar a cabo las reacciones de oxidación estereoselectiva descritos en este documento, las monoaminoxidasas diseñadas se pueden añadir a la mezcla de reacción en la forma de las enzimas purificadas, células enteras transformadas con el gen /es) que codifica/n la oxidasa monoamina, y / o extractos de células y / o lisados de estas células. Las células enteras transformadas con el gen /es que codifica/n la oxidasa monoamina diseñada o extractos de células y / o lisados de los mismos, pueden ser empleadas en una variedad de diferentes formas, incluyendo sólida (por ejemplo, liofilizada, secada por pulverización, y similares) o semisólida (por ejemplo, una pasta cruda).

[0363] Los extractos de células o lisados celulares se pueden purificar parcialmente por precipitación (sulfato de amonio, polietilenimina, tratamiento térmico o similar, seguido de un procedimiento de desalado antes de la liofilización (por ejemplo, ultrafiltración, diálisis, y similares)). Cualquiera de las preparaciones de células puede ser estabilizada por reticulación usando agentes de reticulación conocidos, tales como, por ejemplo, glutaraldehído o inmovilización a una fase sólida (por ejemplo, Eupergit C, y similares).

[0364] Los reactivos sólidos (por ejemplo, enzimas, sales, etc) pueden ser proporcionados a la reacción en una variedad de diferentes formas, incluso en polvo (por ejemplo, liofilizada, secada por pulverización, y similares), solución, emulsión, suspensión, y similares. Los reactivos pueden ser fácilmente liofilizados o secarse por pulverización utilizando métodos y equipos que son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la solución de proteína se puede congelar a -80°C en pequeñas porciones, luego añadida a una cámara de liofilización previamente enfriada, seguida por la aplicación de un vacío. Después de la eliminación de agua de las muestras, la temperatura típicamente se eleva a 4°C durante dos horas antes de la liberación del vacío y la recuperación de las muestras liofilizadas.

[0365] Las cantidades de reactivos utilizados en la reacción de oxidación por lo general, variarán dependiendo de las cantidades de producto deseadas, y concomitantemente la cantidad de sustrato de oxidasa de monoamina empleado. Generalmente, los sustratos se pueden emplear en una concentración de aproximadamente 5 gramos / litro a 50 gramos / litro utilizando desde aproximadamente 50 mg / litro a aproximadamente 5 g / litro de la monoaminooxidasa. Los expertos en la técnica entenderán fácilmente cómo varían estas cantidades al adaptarlos al nivel deseado de productividad y escala de producción. Las cantidades apropiadas de agentes opcionales, tales como catalasa, antiespumantes, y bisulfito de sodio o metabisulfito de sodio se pueden determinar fácilmente por experimentación de rutina.

[0366] El orden de adición de los reactivos no es crítico. Los reactivos se pueden añadir juntos al mismo tiempo a un disolvente (por ejemplo, sistema de disolvente monofásico, bifásico acuoso co-disolvente, y similares), o bien, algunos de los reactivos se pueden añadir por separado, y algunos juntos en diferentes momentos. En ciertas formas de realización, uno o más de los componentes de la reacción se pueden añadir continuamente ("alimentado") a la reacción a niveles que minimicen u obvien el sustrato y / o la inhibición del producto de la monoaminooxidasa. En ciertas formas de realización, la oxidasa monoamina se puede añadir en intervalos en el transcurso de la reacción, por ejemplo, además de aproximadamente cada 1 hora, aproximadamente cada 2 horas, aproximadamente cada 3 horas, o aproximadamente cada 4 horas.

[0367] Las condiciones adecuadas para llevar a cabo las reacciones de oxidación catalizadas por la monoaminooxidasa descritas en este documento incluyen una amplia variedad de condiciones que pueden ser fácilmente optimizadas mediante experimentación de rutina que incluye, pero no se limita a, poner en contacto la monoaminooxidasa diseñada y el sustrato con un pH y temperatura experimentales y detectar el producto, por ejemplo, usando los métodos descritos en los Ejemplos proporcionados en este documento.

[0368] La de la monoaminooxidasa oxidación catalizada se lleva a cabo típicamente a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 5°C a aproximadamente 75°C. Para algunas formas de realización, la reacción se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20° C a aproximadamente 55°C. En otras formas de realización, se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C, aproximadamente 30°C a aproximadamente 45°C, o aproximadamente 40°C a aproximadamente 45°C. La reacción también puede llevarse a cabo en condiciones ambiente (aproximadamente 21 °C).

[0369] La reacción de oxidación generalmente se permite continuar hasta que esencialmente quede completa, o casi completa, la oxidación del sustrato. La oxidación de sustrato en producto puede controlarse usando métodos conocidos mediante la detección del sustrato y / o producto. Los métodos adecuados incluyen la cromatografía de gas, HPLC, y similares. Los rendimientos conversión son generalmente mayores que aproximadamente 50%. Asimismo pueden ser mayores que aproximadamente 60%, 70%, 80%, también pueden ser mayores que 90%, y son a menudo superiores a aproximadamente 97%.

EJEMPLOS

[0370] Varias características y realizaciones de la descripción se ilustran en los siguientes ejemplos representativos, que están destinados a ser ilustrativos, y no limitativos.

Ejemplo 1: Adquisición de tipo salvaje de Gen de Monoaminooxidasa y Construcción de Vectores de Expresión.

[0371] Los genes codificantes de Monoaminooxidasa fueron diseñados para la expresión en E. coli (W3110/huA o UM2) sobre la base de la secuencia de aminoácidos reportada de la de la monoaminooxidasa y un algoritmo de optimización de codones tal como se describe en el Ejemplo 1 de la solicitud provisional de EE.UU. Número de orden 60/848, 950, incorporado aquí como referencia. Los genes fueron sintetizados usando oligonucleótidos compuestos, por ejemplo, de 42 nucleótidos y se clonaron en el vector de expresión pCKI 10900 (representado

como. Fig. 3 en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos 20060195947) bajo el control de un operón lac. El vector de expresión también contiene el origen 5a PI de la replicación y el gen de resistencia a cloranfenicol. Los plásmidos resultantes se transformaron en *E. coli* W3110 utilizando métodos estándar. Los ejemplos de los genes de codones optimizados y los polipéptidos que codifican, como aparecen en la Tabla 4. La actividad de las monoaminooxidasas de tipo salvaje se confirmó usando métodos conocidos en la técnica, o adaptados de la misma, incluyendo los descritos por Zhou et al. (Zhou et al. "A One-Step Fluorometric Method for the Continuous Measurement of Monoamine Oxidase Activity," 1997 *Anal. Biochem.* 253:169-74) y Szutowicz et al. (Szutowicz et al., "Colorimetric Assay for Monoamine Oxidase in Tissues Using Peroxidase and 2,2' Azino(3 ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) as Chromogen," 1984, *Anal. Biochem.* 138:86-94). Las comparaciones de las actividades enzimáticas se realizaron usando una preparación definida de enzima, un ensayo definido bajo un conjunto de condiciones, y uno o más sustratos definidos, como se describe más en detalle en este documento o el uso de los métodos de, por ejemplo, Zhou y Szutowicz. En general, cuando se compararon los lisados, el número de células y la cantidad de proteína analizados fueron determinados, así como el uso de idénticos sistemas de expresión y células huésped idénticas para reducir al mínimo las variaciones en cantidad de enzima producida por las células huésped y presente en los lisados.

Tabla 4: Abreviaciones , Fuente y Citas para Monoaminooxidasas Representativas

Monoamino-oxidasa	Microorganismo de la cual la enzima fue originalmente identificada	Nro. de Adhesión del Genbank	Numero GI	SEC NRO de Polinucleotido	SEC NRO de Polipéptido
MAON	Aspergillus Níger	L38858	619754	1	2
MAO3	Aspergillus oryzae	XM_00182283	169776835	31	32

[0372] Los polinucleótidos codificando monoaminooxidasas diseñadas de la presente manifestación son igualmente clonadas en el vector pCK110900 para la expresión en *E.coli* W3110.

Ejemplo 2: Producción de Monoaminooxidasas en polvo; procedimiento de agitación de matraz.

[0373] Las monoaminooxidasas en polvo fueron producidas desde cultivos de agitación de matraz en la siguiente forma: Una sola colonia microbiana de *E.coli* conteniendo un plásmido con el gen monoaminooxidasa de interés es inoculado en 50 ml de caldo Luria Bertani conteniendo 30 µg/ml cloranfenicol y 1% glucosa. Las células crecen durante la noche (por lo menos 16 hs.) en una incubadora a 30°C con agitación a 250rpm. El cultivo es diluido en 250 ml 2XYT (16g/L bacto- triptona, 10g/L extracto de levadura, 5g/L NaCl, pH 7.0), 1mM MgSO₄, 30µg/ml cloranfenicol en un matraz de 1 litro a una densidad óptica a 600 nm(OD600) de 0.2 y permitido crecer a 30°C. La expresión del gen monoaminooxidasa es inducido con 1mM IPTG cuando el OD600 del cultivo es 0.6 a 0.8 e incubado durante la noche (por lo menos 16 has). Las células son cosechadas por centrifugación (5000 rpm, 15 min, 4°C) y el flotante es descartado. La célula bolita es re-suspendida con una misma solución de volumen de frío (4°C) 100 mM trietanolamina (clorhidrato), pH 7.0 (opcionalmente incluyendo 2mM MgSO₄), y cosechada por centrifugación como anteriormente especificado. Las células lavadas son re-suspendidas en dos volúmenes de una solución trietanolamina (clorhidrato) frío, pH 7.0 y pasadas por una Prensa Francesa dos veces a 12000 psi mientras que mantiene la temperatura a 4°C. Los restos celulares son removidos por centrifugación (9000 rpm, 45 min., 4°C). El lisado transparente flotante es recogido y almacenado a -20°C. La liofilización del lisado transparente congelado provee un polvo seco de enzima monoaminooxidasa cruda.

Ejemplo 3: Producción de Monoaminooxidasa; Procedimiento de Fermentación.

[0374] Las monoaminooxidasas en polvo fueron producidas por fermentación en la siguiente manera: En un fermentador aireado agitado de 15L, 6.0L de crecimiento medio conteniendo 0.88g/L de sulfato amónico, 0.98 g/L de citrato de sodio, 12.5 g/L de trihidrato de fosfato de hidrógeno dipotásico, 6.25g/L de dihidrógeno fosfato de potasio, 6.2 g/L de extracto de levadura Tastone-154, 0.083 g/L de citrato de amonio férrico, y 8.3 ml/L de una solución de elemento de traza conteniendo 2 g/L de dihidrato de cloruro de calcio, 2.2 g/L heptahidrato de sulfato de zinc, 0.5 g/L sulfato de manganeso monohidrato, 1 g/L de heptahidratado de sulfato cuproso, 0.1 g/L de molibdato de amonio tetrahidratado y 0.02 g/L tetraborato de sodio decahidratado son llevados a una temperatura de 30°C. La fermentación es inoculada con un cultivo en crecimiento exponencial tardío de *E.coli* W3110, conteniendo un plásmido con el gen monoaminooxidasa de interés, que se cultiva en un matraz agitado como se describe en el Ejemplo 3 a una OD600 de partida de 0.5 a 2.0. La fermentación es agitada a 500 1500 rpm y el aire es suministrado al recipiente de fermentación a 1.0-15.0 L/min para mantener el nivel de oxígeno disuelto de 30% de saturación o mayor. El pH del cultivo es controlado a 7.0 por adicción del 20% v/v hidróxido de amonio. El crecimiento del cultivo es mantenido por la adición de una solución de alimentación conteniendo 500g/L cerelosa, 12 g/L cloruro amónico y 10.4 g/L sulfato de magnesio heptahidratado. Una vez que el cultivo alcanza un OD600 de 50, la expresión de monoaminooxidasa es inducida por adicción de isopropil-β-D- tiogalactosido (IPTG) a una concentración final de 1mM. El cultivo es luego cultivado por otras 14 horas. El cultivo es enfriado a 4°C y es mantenido a 4°C hasta que es recogido. Las células se recogen por centrifugación a 5000G durante 40 minutos en

un centrifugador Sorvall RC12BP a 4°C. Las células recogidas se utilizan directamente en el siguiente proceso interno de recuperación o son almacenadas a 4°C hasta su uso.

[0375] Cuando las células van a ser utilizadas en el proceso interno de recuperación, el sedimento celular es resuspendido en 2 volúmenes de solución de 100mM de trietanolamina (clorhidrato), pH 6.8, a 4°C para cada volumen de pasta celular húmeda. La monoaminoxidasa intracelular es liberada desde las células pasando la suspensión a través de un homogeneizador equipado con conjuntos de válvula de dos etapas homogenizadas usando una presión de 12000 psig. El homogenado de células se enfría a 4 ° C inmediatamente después de la interrupción. Una solución de 10% w/v polietilimina, pH 7.2, es añadida a una concentración final de 0.5% w/v y se agita por 30 minutos. La suspensión resultante es clarificada por centrifugación a 5000G en un centrifugador de laboratorio estándar durante 30 minutos. La sobrenadante clara es decantada y concentrada diez veces usando una membrana de ultrafiltración de celulosa con un peso molecular cortado de 30Kd. El concentrado final es dispensado en recipientes de poca profundidad, congelados a -20°C y liofilizado a polvo. La monoaminoxidasa en polvo es almacenada a -80°C.

Ejemplo 4: Los métodos analíticos de la conversión de 6,6-dimetil-3-asabicyclo[3.1.0]hexano, compuesto (1) a (1R,5S)-6,6-dimetil-3-asabicyclo[3.1.0]hex-2-ene, compuesto (2).

[0376] La conversión de 6,6-dimetil-3-asabicyclo[3.1.0]hexano y la pureza estereomérica del producto 6,6-dimetil-3-asabicyclo[3.1.0]hex-2-ene fue determinada por el método quiral GC descrito posteriormente. El orden de elución fue: sustrato (1) (tiempo de retención 7min), el deseado (1R,2S)-imina (2) (-10.6 min), el no deseado (1S,2R) imina (-11.0 min) Columna Supelco β-dex 225 (parte#24348), .25mm x 30m x .25um; Temperatura del horno:85°C Isotermico; Flujo de portador: 1.1ml/min; Volumen de inyección: 4 μL; y División de inyección: 100:1; Temperatura del inyector=200°C; detección FID.

Ejemplo 5: los métodos analíticos para la conversión octahidrociclopental[c]pirrol, compuesto (3) a (3aS,6aR)-1,3a,4,5,6,6a-hexahidrociclopental[c]pirrol, compuesto (4)

[0377] La conversión de octahidrociclopental[c]pirrol y la pureza estereomérica del producto fue determinada usando el método quiral GC descrito posteriormente. El orden de elución fue: sustrato (3) (tiempo de retención 2.7 min), el deseado(3aS,6aR) imina (4) (-5.5min), el no deseado (3aR,6aS)-imina (-5.8 min). El dímero imínico de imina (4) termolisa a la imina en el puerto inyector. Columna: Supelco β-dex 225 (parte#24348), .25mm x 30m x .25um; Temperatura del horno: 120°C Isotermico; Flujo de portador : 1.1 ml/min; Volumen de inyección: 4 μL; y División de inyección: 100:1; temperatura del inyector=200°C; detección FID.

Ejemplo 6: La evaluación de Monoaminoxidasas de Estado Silvestre por oxidación de 6,6-dimetil-3-asabicyclo[3.1.0]hexano, compuesto (1)

[0378] Las monoaminoxidasas en estado silvestre descritas aquí fueron seleccionadas por su habilidad para oxidar 6,6 dimetil-3-asabicyclo [3.1.0] hexano, compuesto (1) a 6,6-dimetil-3-asabicyclo[3.1.0]hex-2-ene, compuesto (2). A un matraz de 3 bocas de 50 ml bajo aire se añadieron 25mL de 100mM pH 3.0 de solución de fosfato de potasio y 330 μL de 6,6-dimetil-3-asabicyclo[3.1.0]hexano para proveer una solución homogénea. El pH fue ajustado a aproximadamente 7.3 vía conc. H₃PO₄. A la solución ajustada de pH fueron adheridos una suspensión de 60 μL de *A. Níger* catalasa (Sigma Aldrich; número del catálogo C-3515) y 150 mg de monoaminoxidasa en polvo de estado silvestre (preparado por el método de agitación de matraz del Ejemplo 2) con SEC NRO 2 (*A. Níger*) o SEC NRO 32 (*A. oryzae*) en solución de fosfato de potasio con pH 8.0. La solución resultante amarilla pálida fue agitada en aire por 24 horas. El pH fue mantenido a 7.2 vía adición de realimentación controlada de 1N NaOH en porciones 1-5 μL. (El reactivo amino es protonado al pH neutral; el producto imino no es. La acción libera un protón que debe ser neutralizado para mantener el pH).

[0379] Las reacciones templaron con 10N NaOH para traer el pH a aproximadamente 14 y la mezcla fue extraída con CDCl₃ usando centrifugación para separación de fases. 1H-NMR análisis de la solución CDCl₃ de la reacción usando la monoaminoxidasa *A. Níger* en estado silvestre indicada 20%convercion del amino (1) al imina (2) . La reacción con la monoaminoxidasa *A. oryzae* en estado silvestre consumió alrededor de dos veces la cantidad de la solución NaOH en comparación a la reacción con la aminooxidasa *A. Níger* en estado silvestre, indicando que alrededor doble de la cantidad de amino (1) fue transformado.

[0380] El análisis quiral GC conforme al método del Ejemplo 4 mostro la deseada (1R,5S)-imina (2). El enantiomero no deseado (1S,5R)-imina no fue detectado.

[0381] Este ejemplo demuestra que estas monoaminoxidasas de estado silvestre tienen una baja actividad en 6,6 dimetil-3-asabicyclo[3.1.0]hexano, compuesto (1) y se convierte en el deseado (1R,5S)-imina (2).

Ejemplo 7: la evaluación de una monoaminoxidasa de estado silvestre por oxidación de octaciclopenta[c]pirrol, compuesto (3)

[0382] Las monoaminooxidasas en estado silvestre descritas aquí fueron seleccionadas por su habilidad de oxidar (octahidrociclopenta[c]pirrol, compuesto (3) a (3aS,6aR) 1,3^a,4,5,6,6ahexahidrociclopenta[c]pirrol), compuesto (4). A un frasco de tres bocas de 50-mL en aire fue adherido un tampón de 25mL de 100mM pH 8.0 de fosfato de potasio y 375 mg de octahidrociclopenta[c]pirrol clorhidrato y el pH fue ajustado a aproximadamente 7.3 con 1N NaOH. A la solución de pH ajustada fue adherida 60 µL de suspensión de catalasa *A. Níger* (adquirido por Sigma Alrich; número de catálogo C-3515) y 150 mg de la monoaminooxidasa en estado silvestre en polvo (preparada por el método de agitación de matraz del Ejemplo 2) con SEC NRO 2 (*A. Níger*) en solución de fosfato de potasio en pH8.0. La solución amarilla pálida resultante fue mezclada en aire por 24 horas. El pH fue mantenido a 7.2 vía adición de realimentación controlada de 1 N NaOH en porciones 1-5 µL. Poco o ningún consumo de NaOH fue observado por 24 horas. La reacción fue templada con 10 N NaOH para traer el pH a aproximadamente 14 y la mezcla fue extraída con CDCl₃. Luego de la fase de separación vía análisis centrifugador (6000 rpm por 5 min), 1H-NMR de la solución CDCl₃ indico poco o ninguna conversión de la amino (3) a la imina (4).

[0383] El ejemplo siguiente demuestra que las monoaminooxidasas tienen poca, si alguna actividad en octahidrociclopenta[c]pirrol, compuesto (3).

Ejemplo 8: Las mezclas de alto rendimiento de la actividad de monoaminooxidasa en 6,6-dimetil-3-asabiciclo[3.1.0]hexano, compuesto (1).

[0384] Las librerías plásmidas obtenidas por evolución dirigida y conteniendo genes evolucionados de monoaminooxidasa son transformadas en *E.coli* y revestidas en caldo Luria-Bertani (LB) conteniendo 1% glucosa y 30 µg/mL cloranfenicol (CAM). Luego de la incubación de por lo menos 16 hs a 30°C, las colonias son seleccionadas usando un recolector de colonia robótico Q-bot® (Genetix USA, Inc., Beaverton, OR) en 96 placas con pocillos de poca profundidad micro tituladoras conteniendo 180 µL de caldo Terrific (TB), 1% glucose, 30 µL cloranfenicol (CAM), y 2 mM MgSO₄. Las células se cultivan durante la noche a 30°C con agitación de 200 rpm. 20 µL de este cultivo fue luego transferida en 96 pocillos profundos conteniendo 350 µL caldo Terrific (TB), 2mM MgSO₄ y 30 µg/mL CAM. Luego de la incubación de los pocillos profundos a 30°C con agitación a 250 rpm a 2.5 por 3 horas (OD₆₀₀ 0.6-0.8), la expresión del gen recombinante por cultivos de células es inducido por adición de isopropil β D tiogalactosa (IPTG) a una concentración final de 1mM. Las placas son luego incubadas a 30°C con agitación a 250 rpm de 15-23 hs.

[0385] Las células fueron sedimentadas por centrifugación, resuspendidas en una solución de lisis de 400 µL y lisadas por agitación a temperatura ambiente por lo menos por dos horas. La solución de lisis contenía una solución de fosfato de sodio de 50mM, pH 7.0, 1mg/mL lisozima y 500 µg/mL polimixina B sulfato. Los restos celulares fueron sedimentados por centrifugación.

[0386] La actividad de monoaminooxidasa fue medida mediante la transferencia de aproximadamente 20 µL de lisado transparente flotante a placas de pocillos de 96 micro tituladores profundos con 180 µL de una mezcla ensayo conteniendo una solución de fosfato de sodio de 50 mM (pH7.5), 4 U/ml catalasa *A. Níger* (Sigma-C3515) y 40 mM 6,6-dimetil-3-asabiciclo [3.1.0]hexano provisto como su sal de ácido acético. Las placas de ensayo fueron selladas y agitadas a temperatura ambiente por 4 horas. Las reacciones fueron templadas por adición de 500 µL 1:1 agua acetonitrilo y las placas fueron centrifugadas. Luego de la centrifugación, 150 µL de la flotante fue transferida a una placa de poca superficie para análisis HPLC por el método conforme al Ejemplo 4.

[0387] Condiciones HPLC: columnas de tamaño de micro partículas 2.1 x 75mm Zorbax Eclipse XDB C-18 3.5 a 40°C con una fase móvil de 60:40 40 mM acetato de amonio/acetonitrilo a 0.5 mL/min. La imina eluida a -1 minuto (254nm). Solo la imina puede ser detectada y el ranking de actividad de las variantes fue realizado usando el área máxima absoluta de la señal iminal.

[0388] Alternativamente, las reacciones de la mezcla fueron templadas con 100 µL de 10 NaOH y extraídas con 1:1 v/v MTBE y sometidas análisis quiral GC por el método del Ejemplo 4.

Ejemplo 9: las mezclas de alto rendimiento por actividad monoaminooxidasa en octahidrociclopenta[c]pirrol, Compuesto (3).

[0389] Los lisados conteniendo variantes de monoaminooxidasa en placas de 96 pocillos fueron preparadas como se habían descrito en el Ejemplo 8.

[0390] La actividad monoaminooxidasa fue medida transfiriendo 50 µL de lisado transparente a las placas profundas de 96 micro tituladores con 450 µL de una mezcla de ensayo conteniendo una solución de fosfato de sodio de 100mM (pH 7.5), 4 U/ml catalasa *A. Níger* (Sigma-C3515) y 50 mM octahidrociclopenta[c]pirrol. Las placas de ensayo fueron selladas y agitadas a temperatura ambiente por 16 horas. Las placas fueron centrifugadas y 100 µL del flotante fue templado en placas de 100µL acetonitrilo en los pocillos de poca superficie por análisis HPLC de acuerdo al Ejemplo 5.

[0391] las reacciones fueron templadas por adición de 100 µL acetonitrilo y las placas fueron centrifugadas. Luego

de la centrifugación, 100 μ L del flotante fue 100 μ L de acetonitrilo y fue transferido a una placa de poca profundidad por análisis HPLC por el método conforme al Ejemplo 4.

5 **[0392]** Condiciones HPLC: 2.1 x 75 mm Zorbax Eclipse XDB C-18 3.5 columna de tamaño micro particular a 40°C con una fase móvil de 70:30 40 mM acetato de amonio/acetonitrilo a 0.5 mL/min. La imina eluida a 1.3 minuto(254nm). Solo la imina puede ser detectada y el ranking de las variantes fueron hechas usando el área máxima absoluta de señal iminal.

10 **[0393]** Alternativamente, la reacción fue templada con 100 μ L de 10 N NaOH y extraída con 1:1 v/v MTBE y sometida a análisis quiral GC Ejemplo 5.

[0394] Este ejemplo describe el método que fue utilizado para identificar variantes de monoaminooxidasa mejoradas por oxidación del octahidrociclopenta[c]pirrol, Compuesto (3).

15 Ejemplo 10: La escala de producción preparativa de (1R, 5S)-6,6-dimetil-3-asabiciclo[3.1.0]hex-2-ene, Compuesto (2).

20 **[0395]** A 500-mL un matraz de 4 bocas equipado con agitador de cabeza a 300 rpm fue adherido 150 mL de agua Mili-Q a alrededor de 25°C, y 1,2 mL (aproximadamente 1.0g, aproximadamente 9mmol) de 6,6-dimetil-3-asabiciclo[3.1.0]hexano para dar una solución homogénea con un pH de 11.8. Na₂S₂O₅ fue adherido en porciones hasta que pH7.5 fue alcanzado. A la solución incolora fueron adheridos 300 μ L de un Antiesfumante-204 (Sigma número de catálogo A-6226) y 600 μ L de suspensión catalasa *A. niger* (Sigma Aldrich; número de catálogo C-3515) para dar una solución incolora a 7.5 pH. A esta solución fue adherida 1.5g de polvo monoaminooxidasa (producido por fermentación de acuerdo al Ejemplo 3) con SEC NRO 10 para dar una solución amarilla. Una sonda de burbujeo de aire (velocidad de flujo de aire 60mL/min) y el pH de la mezcla de reacción comenzó a descender inmediatamente. El pH fue mantenido vía control de feedback de dosificación de 2N NaOH. Luego de aproximadamente 30 minutos, el pH permaneció estable y no se produjo mas dosificación de base. Luego de unos 10 minutos adicionales (40 minutos totales), la solución 120 mL de 6,6-dimetil-3-asabiciclo[3.1.0]hexano NaHSO₃ (preparada mediante la adicción de 20.8g de 6,6-dimetil-3-asabiciclo[3.1.0]hexano a 150 mL de dH₂O y adhiriendo suficiente Na₂S₂O₅ para alcanzar 7.2 pH) fue adherido a la reacción a una velocidad a 0.25 ml/min. El pH de la mezcla de reacción comenzó a decaer inmediatamente y la dosificación de 2N NaOH se reanudo. La adicción de la solución de 6,6-dimetil-3-asabiciclo[3.1.0]hexano y NaHSO₃ fue completada luego de aproximadamente 8 horas (9 horas de tiempo total de reacción). La adicción de la base continuo y la medida de la adición de la base incremento luego que la adición del sustrato fue completada. Una alícuota de 200 μ L fue tomada, templada con 200 μ L de 8 N NaOH (para romper el sulfonato amino para la imina libre) y extraída con 600 μ L de CDCl₃. El análisis 1H-NMR del extracto CDCl₃ mostro una conversión completa del sustrato (1) a asabiciclo[3.1.0]hex-2-ene compuesto (2) (1h-NMR (300 MHz, CDCl₃) espectro: δ 7.42(s, 1H, N=C-H), 3.81 (dd;j=6.1,17.8;1H), 3.50 (dd=j2.1, 17.8; 1H), 2.06 (m;1H), 1.62(m, 1H), 1.03(s, 3), 0.80(s,3H)).

40 **[0396]** El análisis quiral GC mostro que (1R, 5S) enantiomero (2) con no enantiomero detectable (1S, 2R).

[0397] La mezcla de reacción fue usada "como es" para la reacción de cianacion del aminonitrilo).

45 Ejemplo 11: la desimetrización de la monoaminooxidasa catalizada de 6,6-dimetil-3-asabiciclo[3.1.0]hexano (1) a (1R,5S)-6,6-dimetil-3-asabiciclo[3.1.0]hex-2-ene (2) bajo una manta estática de aire.

50 **[0398]** A un matraz de 3 bocas de 50-mL bajo aire fue adherido 25mL de solución de 100 mM pH 3,0 de fosfato de potasio y 330 μ L de 6,6-dimetil-3-asabiciclo[3.1.0]hexano para dar una solución homogénea. El pH fue ajustado a aproximadamente 7.5usando H₃PO₄ concentrado. A la solución de pH ajustado fue adherido 60 μ L de suspensión *A. Níger* catalasa (Sigma Aldrich numero de catálogo C-3515) y 150 mg de polvo monoaminooxidasa (preparado por el método del Ejemplo 2) con SEC NRO 4,6 o 8 en pH 8,0 de solución de fosfato de potasio. La solución amarilla pálida resultante fue mezclada bajo aire por 24 horas. El pH fue mantenido a 7.4 vía feedback controlado de adición de porciones de 1 N NaOH en 1-5 μ L. la reacción fue templada posteriormente con 10 N NaOH para traer el pH a aproximadamente 14. Un ejemplo de la mezcla fue extraído con CDCl₃. Luego de la fase de separación vía centrifugador (600 rpm por 5 minutos), análisis 1H-NMR indico que al menos 95% de conversión la amina (1) a la imina (2). El análisis quiral GC por el método del Ejemplo 4 mostro (1R,5S)-entiomero de imina (2). El enantiomero (1S,2R) no fue detectado.

60 Ejemplo 12: La desimetrización de la monoaminooxidasa catalizada de 6,6-dimetil-3-asabisiclo[3.1.0]hexano(1) a (1R,5S)-6,6-dimetil-3-asabiciclo[3.1.0]hex-2-ene(2) bajo una manta de oxígeno.

65 **[0399]** A una matraz de 3 bocas de 50-mL bajo aire fueron adheridos una solución de fosfato de potasio de 25 mL de 100 mM 3.0 pH y 330 μ L de 6,6-dimetil-3-asabisiclo[3.1.0]hexano para una solución homogénea . El pH fue ajustado a aproximadamente 7,5 con H₃PO₄ concentrado. A la solución de pH ajustado fueron adheridos 60 μ L de suspensión de *A. Níger* catalasa (Sigma Aldrich; número de catálogo C-3515) y 150 mg de polvo monoaminooxidasa de polipéptidos de SEC NRO 4,6 o 8 (preparado por el método Ejemplo 2) en una solución de fosfato de potasio pH

8.0. El espacio frontal pasó por una corriente de oxígeno y la solución amarilla pálida resultante fue agitada bajo aire por 24 horas. El pH fue mantenido a 7,4 vía adición de feedback controlado de 1N NaOH en porciones de 1-5 µL. La reacción fue templada posteriormente con 10 N NaOH para traer el pH a aproximadamente 14. Un ejemplo de la mezcla fue extraído con CDCl₃. Luego de la fase de separación vía centrifugador (600 rpm por 5 minutos), análisis 1H-NMR indico que al menos 95% de conversión la amina (1) a la imina (2). El análisis quiral GC por el método del Ejemplo 4 mostro (1R,5S)-entiomero de imina (2). El enantiomero (1S,2R) no fue detectado.

Ejemplo 13: La desimetrización de la monoaminoxidasa catalizada de 6,6-dimetil-3-asabisciclo [3.1.0]hexano(1) a (1R,5S)-6,6-dimetil-3-asabisciclo[3.1.0]hex-2-ene(2) con aire burbujeando en la presencia de bisulfito.

[0400] A un matraz de 100 ml se añadió 40 ml de dH₂O y 1,8 ml de 6,6-dimetil-3-azabisciclo [3.1.0] hexano para obtener una solución homogénea con un pH de aproximadamente 11,4. A esta solución se añadió 2,7 g de Na₂S₂O₅ para proveer una solución homogénea y el pH se ajustó a aproximadamente 7,5 por la adición de aproximadamente 1 ml de 8 N de NaOH. A esta solución se añadió 60 µL de Antiespumante-204 (número de catálogo Sigma A-6226) 120 µL suspensión de A. niger catalasa (número de catálogo Sigma Aldrich C-3515) y 300 mg de polvo de monoamina oxidasa de polipéptido de la SEC NRO: 8 (preparada por el método del Ejemplo 2) en 10 ml de 100 pH 8.0 mM de solución de fosfato potásico. Se roció aire a la mezcla de la reacción a través de vidrio poroso y la solución de color amarillo pálido resultante se agitó con burbujeo de aire durante 24 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 21 ° C) durante 24 horas. El pH se mantuvo a 7,4 mediante la adición de NaOH 2,5 N por retroalimentación controlada en porciones de 1 pl. La reacción se redujo y el aducto de imina-bisulfito (el aminosulfonato) se rompió para liberar la imina con NaOH 10 N para llevar el pH a aproximadamente 14 y se extrajo el producto aislado mediante extracción en MTBE. Después de la separación de fases, (1R, 5S) -6,6-dimetil-3-azabisciclo [3.1.0] hex-2-eno se aisló por destilación con un rendimiento del 86%. El análisis por ¹H-RMN en CDCl₃ (como en el Ejemplo 10) confirmó la conversión del compuesto (1) en el compuesto de imina (2). El análisis GC quiral por el método del Ejemplo 4 mostró (1R, 5S)-imina enantiómero (2). No se detectó el enantiómero (1S, 2R).

[0401] El (1R, 5S) -6,6-dimetil-3-azabisciclo [3.1.0] hex-2-eno así obtenido se trató con 1,0 equiv. de NaHSO₃ en D₂O. 'el análisis H-RMN indicó una conversión cuantitativa al aducto de bisulfito (H-RMN (300 MHz, D₂O) espectro: 8 4,8 (d, J = 1, 1H (NC (H) S03; diastereómero principal), 4,5 (d, J = 5, 1H (NC (H) S03; diastereoisómero menor), 3,4-3,6 (m, 2H; diastereoisómero menor), 3,25 (dd, J = 3, 10, 1H, diastereoisómero principal), 3,05 (dd, 1H, J = 1, 10; diastereómero principal), 1,65 (m, 1H, diastereoisómero mayor y menor), 1,55 (m, 1H, diastereoisómero mayor y menor), 1,22 (s, 3H, diastereoisómero menor), 1,15 (s, 3H; menor diastereómero), 1,10 (s, 3H, diastereómero principal), 1,00 (s, 3H; diastereoisómero menor).

Ejemplo 14: desimetrización de monoamina oxidasa catalizada de 6,6-dimetil-3-azabisciclo [3.1.0] hexano de (1R, 5S) -6,6-dimetil-3-azabisciclo [3.1.0] hex-2-eno con rociado de aire y adición concomitante del sustrato y el bisulfito.

[0402] Para el matraz de 4 bocas de 500 ml a temperatura ambiente (aproximadamente 21 ° C) equipado con un agitador superior a 300 rpm se añadió 150 ml de agua Milli-Q y 1,2 ml (aproximadamente 1,0 g, aproximadamente 9 mmoles) de 6, 6-dimetil-3-azabisciclo [3.1.0] hexano para dar una solución homogénea con un pH de 11,8. Se añadió Na₂S₂O₅ en porciones hasta que se alcanzó un pH 7,5. A la solución incolora se añadió 300 µL de Antiespumante-204 (número de catálogo Sigma A-6226) y 600 µL de suspensión de catalasa A. niger (número de catálogo Sigma Aldrich C-3515) para dar una solución incolora con pH 7,5. A esta solución se añadió 1,5 g de un polvo de monoaminoxidasa de polipéptido de la SEC NRO: 8 (preparada por el método del Ejemplo 3) para dar una solución de color amarillo. Se insertó una sonda rociadora de aire y se roció aire en la reacción a una velocidad de ~ 60 ml / min y se observó que el pH de la mezcla de la reacción empezó a caer inmediatamente. El pH fue mantenido a través de la adición controlada por retroalimentación de 2 NaOH . Después de aproximadamente 30 minutos, el pH se mantuvo estable y no se produjo adición de base adicional. Después de un período adicional de 10 minutos (40 minutos en total), se añadió a la mezcla de la reacción 120 ml de una solución 6,6-dimetil-3-azabisciclo [3.1.0] hexano/NaHSO₃ (20,8 g de 6,6-dimetil-3-azabisciclo [3.1.0] hexano con 150 ml de dH₂O y Na₂S₂O₅ suficiente para alcanzar un pH de 7,2) a una velocidad de 0,25 ml / min. El pH de la mezcla de la reacción empezó a caer inmediatamente y la adición de 2 N NaOH se reanudó. La adición de 6-dimetil-3-azabisciclo [3.1.0] hexano/NaHSO₃ se completó después de aproximadamente 8 horas (9 horas de tiempo de reacción total). La adición de base continuó y la tasa de adición de base aumentó una vez completada la adición del sustrato. La reacción se inactivó con 10N NaOH para llevar el pH a aproximadamente 14 (y romper el aducto de imina-bisulfito) y la mezcla se extrajo con MTBE. Después de la separación de fases, se aisló (1R, 5S) -6,6-dimetil-3-azabisciclo [3.1.0] hex-2-eno por destilación de la solución de MTBE con un rendimiento del 72%. El análisis por ¹H-RMN en CDCl₃ (como en el Ejemplo 10) confirmó la conversión del compuesto (1) en el compuesto imina (2). El análisis GC quiral por el método del Ejemplo 4 mostró (1R, 5S)-imina enantiómero (2). No se detectó el enantiómero (1S, 2R).

Ejemplo 15: Preparación de (1R, 2S, 5S) -6,6-dimetil-3-azabisciclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo (modo de sustrato estático).

[0403] A un matraz de 100 ml se añadió 40 ml de dH₂O y 1,8 ml de 6,6-dimetil-3-azabisciclo [3.1.0] hexano, para proporcionar una solución homogénea con un pH de aproximadamente 11,4. A esta solución se añadió 2,7 g de Na₂S₂O₅ para proveer una solución homogénea y el pH se ajustó a aproximadamente 7,5 con aproximadamente 1

ml de 8 N NaOH. A esta solución se añadieron 60 pL de Antiespumante-204 (número de catálogo Sigma A-6226), 120 pL de suspensión de catalasa A. niger (número de catálogo Sigma Aldrich C-3515) y 300 mg de polvo de monoamina oxidasa del polipéptido de la SEC NRO 8 (preparada por el método del Ejemplo 2) en 10 ml de 100 mM de solución de fosfato de potasio con pH 8,0. Se roció aire a la mezcla de la reacción a través de vidrio poroso a una velocidad de ~ 10 ml / min y la solución de color amarillo pálido resultante se agitó en aire a temperatura ambiente (aproximadamente 21 ° C) durante 24 horas. En este lapso, el pH se mantuvo a 7,4 mediante la adición por retroalimentación controlada de 2,5 N NaOH en porciones de 1 pL. Después de 24 horas, se añadió 1,0 g (1,3 equiv) de NaCN a la mezcla de la reacción, comprendiendo entonces (IR, 2S, 5S) -6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-sulfonato. Después de agitar a temperatura ambiente (aproximadamente 21 ° C) durante un período adicional de 15 minutos, la mezcla se extrajo con MTBE. (también se puede utilizar 2-Me-THF para la extracción.) Después de la separación de fases y la eliminación del disolvente, se aislaron 1,78 g de un sólido de color amarillo pálido (rendimiento 90%) de (IR, 2S, 5S) -6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo. El análisis por ¹H-NMR en CDCl₃ confirmó preparación de (IR, 2S, 5S) -6,6 - dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo (¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) espectro : 8 3,92-(d, J = 1,2, 1H, NC (H) (CN)), 3,25 (m, 1H), 2,96 (dd, J = 2,1, 17,0), 1,48 (dd, J = 1, 2, 12,2 ; 1H), 1,42 (m, 1H), 1,13 (s, 3H), 1,11 (s, 3H)).

[0404] Cuando se produjo de este modo una mezcla de reacción que comprende (IR, 2S, 5S) -6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-sulfonato y se trató con 3,0 equiv. de NaCN a temperatura ambiente durante 12 horas, se observó en mezcla un 25% menos del estereoisómero cis no deseado (IR, 2R, 5S) -6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo con el estereoisómero trans deseado (1R, 2S, 5S). El ¹H-RMN en CDCl₃ mostró el protón metino cw-aminonitrilo como un doblete (J = 4,2) a 4.22 ppm.

Ejemplo 16: Preparación de (IR, 2S, 5S) -6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo (modo de adición del sustrato continua).

[0405] Paso 1. A un matraz de 4 bocas de 500 ml a temperatura ambiente (aproximadamente 21 ° C) equipado con un agitador superior (de 300 rpm) se añadieron 150 ml de agua Milli-Q y 1,2 ml (aproximadamente 1,0 g y 9 mmol) de 6, 6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano para dar una solución homogénea con un pH de 11,8. Se añadió Na₂S₂C₂O₈ en porciones hasta que el pH alcanzó 7,5. A la solución incolora se añadieron 300 pL de Antiespumante-204 (número de catálogo Sigma A-6226) y 600 pL de suspensión de catalasa A. niger (número de catálogo Sigma Aldrich, C-3515) para obtener una solución incolora con pH 7,5. A esta solución se añadieron 300 mg de polvo de monoaminooxidasa (preparada por el método del Ejemplo 3) con la SEC NRO 12 para proporcionar una solución de color amarillo. Se insertó una sonda rociadora de aire (con una tasa de flujo de aire de ~ 60 ml / min) y el pH de la mezcla de la reacción empezó a caer inmediatamente. El pH se mantuvo a través de la adición controlada de 2 N NaOH por retroalimentación. Después de aproximadamente 40 minutos, el pH se mantuvo estable y no se produjo más adición de base. Después de un período adicional de 10 minutos (50 minutos en total), se obtuvo 150 ml de 6,6 - dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] NaHSOs de solución de hexano (26,1 g de 6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano con 160 ml de (H₂O y Na₂S₂O₅ suficientes para alcanzar un pH de 7,2) a una tasa de 0,12 ml / min. El pH de la mezcla de la reacción empezó a caer inmediatamente y se reanudó la adición de 2 N NaOH. La adición de 6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano/NaHSO₃ se completó después de aproximadamente 21 horas (aproximadamente 22 horas de tiempo de reacción total). La adición de base continuó a una mayor tasa una vez completada la adición de sustrato. Después de 24 horas, se consideró completa la reacción mediante análisis ¹H RMN.

[0406] Paso 2. Después de 24 horas, la reacción se consideró completa por análisis de ¹H-RMN, se añadieron 10,0 g de NaCN (1,11 equiv.) a la mezcla de la reacción para así obtener una mezcla de reacción de color lechoso con un pH de 9,9. Después de 24 horas, la reacción se consideró completa por el análisis ¹H RMN. Después de 30 minutos, la reacción se extrajo con 300 ml de MTBE. La fase acuosa inferior se drenó (aproximadamente 250 ml) y la capa orgánica superior se filtró a través de 6 g (2 "diámetro x ¼" de altura) de Celite ®. La Celite ® se lavó con 300 ml de MTBE y el MTBE utilizado en el enjuague de Celite ® se utilizó para extraer la fase acuosa. Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron a presión reducida usando un evaporador rotatorio a 40 ° C durante 1 hora para dar un sólido de color blanco. El sólido blanco se secó posteriormente a presión reducida durante 30 minutos para dar 23,9 g (rendimiento 95%) de (IR, 2S, 5S) -6,6 - dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo.

Ejemplo 17: Preparación de éster metílico del ácido hexano-2-carboxílico [3.1,0] 6,6-dimetil-3-azabicyclo

[0407] El (IR, 2S, 5S) -6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo preparado según el Ejemplo 16 o 17 se convierte sustancialmente en el correspondiente éster metílico de ácido (1R, 2S, 5S)-dimetil -3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carboxílico enantioméricamente puro por el procedimiento descrito en la Solicitud Internacional PCT WO 2007/075790.

Ejemplo 18: Preparación de (IR, 2S, 5S) -6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo, efecto de equivalentes de NaCN y tiempo de reacción de la relación trans/cis del aminonitrilo.

[0408] El procedimiento fue idéntico al del Ejemplo 15 hasta la adición de NaCN, con las excepciones de que la potencia de la monoaminooxidasa de la SEC NRO 8 se preparó por el método del Ejemplo 3. Después de 24 horas,

se añadió NaCN en porciones a la mezcla de la reacción como se muestra en la Tabla 5 (El 1,0 equivalente de NaCN fueron 720 mg de 95% de NaCN). Después de cada intervalo de tiempo prescrito, se tomó una alícuota de 200 pL, extraída con 1 ml de CDCl₃ y luego analizada mediante NMR-¹H. La proporción dada trans/cis (la relación entre los epímeros deseados 2S y los no deseados 2R de (1R, 5S) -6,6 - dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo) se determinó por la integración IH-RMN de la resonancia del protón aminonitrilo metina (trans = doblete a 3,92 ppm; cis = doblete a 4,22 ppm).

Tabla 5

Tiempo [min]	NaCN agreg. [equiv.]	NaCN Total [equiv.]	Tiempo desde adición previa [min]	pH	%conv. [¹ H-NMR]	Trans/cis [¹ H-NMR]
0	1.0	1.0	0	10.5	ND ¹	ND
20	—	1.0	20	10.5	92	>100 [^]
60	—	1.0	60	10.6	92	>100
90	0.5	1.5	30	10.8	97	>100
150	—	1.5	60	10.8	96	26
210	0.5	2.0	60	11.0	98	19
230	1.0	3.0	20	11.1	98	16
350	—	3.0	120	11.2	98	12

¹. ND = no determinado. . ²>100 significa resonancia de metina cis no detectada.

[0409] Después de la alícuota final, la mezcla de la reacción se extrajo con 100 ml de acetato de etilo y se filtró a través de arena gruesa para obtener una separación de fases limpia. Se añadieron 20 ml de heptano a la fase orgánica. La fase orgánica se evaporó hasta la sequedad mediante evaporación rotatoria al vacío a 40 ° C durante 1 hora. el análisis ¹H-NMR indicó que la relación trans/cis se mantuvo en 12:1.

Ejemplo 19; Preparación de (1R, 2S, 5S) -6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo; robustez del proceso.

[0410] Paso 1. A un matraz de 4 bocas de 500 ml a temperatura ambiente (aproximadamente 21 ° C) equipado con un agitador superior (300 rpm) se añadió 150 ml de agua Milli-Q y 1,2 ml (aproximadamente 1,0 g y 9 mmol) de 6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano para obtener una solución homogénea con un pH de 11,8.

Na₂S₂O₅ Se añadió en porciones hasta que el pH alcanzó 7,5. A la solución incolora se añadieron 300 pL de Antiespumante-204 (número de catálogo Sigma A-6226) y 600 pL de suspensión de catalasa A. niger (número de catálogo Sigma Aldrich, C-3515) para obtener una solución incolora con pH 7,5. A esta solución se le añadieron 300 mg de polvo de monoaminoxidasa (preparada por el método del Ejemplo 3) con la SEC NRO 12 para proporcionar una solución de color amarillo. Se insertó una sonda rociadora de aire (con una tasa de flujo de aire de ~ 60 ml / min) y el pH de la mezcla de la reacción empezó a caer inmediatamente. El pH se mantuvo mediante adición controlada de 2 N NaOH por retroalimentación. Después de aproximadamente 40 minutos, el pH se mantuvo estable y no se produjo más adición de base. Después de un período adicional de 10 minutos (50 minutos en total), se le añadieron a la mezcla de la reacción 150 ml de 6,6 dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano NaHSC> solución 3 (26,1 g de 6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano con 160 ml de dH₂O y Na₂S₂O₅ suficiente para alcanzar un pH de 7,2) a una velocidad de 0,12 ml / min. El pH de la mezcla de la reacción empezó a caer inmediatamente y se reanudó el añadido de 2 N NaOH. La adición de 6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano/NaHSO₃ se completó después de aproximadamente 21 horas (aproximadamente 22 horas de tiempo de reacción total). La adición de base continuó a una mayor tasa una vez completada la adición de sustrato. Después de 24 horas, la reacción se consideró completa por análisis de IH NMR.

[0411] Paso 2. Después de 24 horas, se añadieron 13,5 g de NaCN (1,5 equiv.) a la mezcla de la reacción para así obtener una mezcla de reacción de color lechoso con un pH de 9,9. Se tomaron alícuotas de 200 pL luego que la mezcla fuera agitada a temperatura ambiente durante 15 y 45 minutos. Las alícuotas se extrajeron con 1 ml de CDCl₃ y lo extraído se analizó mediante ¹H-NMR. El estereoisómero cis estaba por debajo del límite de detección de ¹H-NMR en ambos puntos temporales.

[0412] Después de ~ 60 minutos de la adición de NaCN, la reacción se extrajo con 300 ml de MTBE. La fase acuosa inferior se drenó (aproximadamente 250 ml) y la capa orgánica superior se filtró a través de 6 g (2 "diámetro x ¼" de altura) de Celite®. El Celite® se lavó con 300 ml de MTBE y el MTBE utilizado en el enjuague de Celite® se utilizó para extraer la fase acuosa. Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron a presión reducida usando un evaporador rotatorio al vacío a 40 ° C durante 1 hora para proporcionar un sólido de color blanco. El sólido blanco se secó posteriormente a presión reducida durante 30 minutos para dar 22,5 (rendimiento 90%) de (1R, 2S, 5S) -6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo. El epímero cis (2R) era inferior al límite de detección de ¹H-NMR.

[0413] Este ejemplo ilustra que este aminonitrilo permanece en forma estereoméricamente pura después de una hora a temperatura ambiente a pH 9,9 y en presencia de 0,5 equiv de exceso de cianuro.

Ejemplo 20: Preparación de (1R, 2S, 5S) -6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo; robustez del proceso.

[0414] Paso 1. El procedimiento fue idéntico al Paso 1 del Ejemplo 18.

[0415] Paso 2. Después de 24 horas, se añadieron 11,0 g de NaCN (1,22 equiv) a la mezcla de la reacción para así obtener una mezcla de reacción de color lechoso con un pH de 9,9. Después de agitar a temperatura ambiente durante 10 minutos, se tomó una alícuota de 200 µL, extraída con 1 ml de CDCl₃. El análisis de ¹H-NMR de la solución del extracto indicó la conversión completa a (1 R, 2S, 5S) -6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] hexano-2-carbonitrilo, y el aminonitrilo trans sin ningún estereoisómero cis 2R detectable.

[0416] La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas adicionales. Después de 16 horas el análisis ¹H-NMR indicó una relación aminonitrilo trans/cis de ~ 15:1 (la relación trans/cis se determinó por la integración ¹H-NMR del protón metino aminonitrilo: trans = doblete a 3,92 ppm; cis = doblete a 4,22 ppm).

Ejemplo 21: la desimetrización de monoaminoxidasa catalizada de octahidrociclopenta [c] pirrol a (3aS, 6aR)-I, 3a, 4,5,6,6 a-hexahidrociclopenta [c] pirrol en aire estático.

[0417] A un matraz de 3 bocas de 50 ml bajo aire se añadieron 25 ml de con pH 8,0 solución de fosfato de potasio y 375 mg de octahidrociclopenta [c] pirrol seguido por el ajuste del pH a aproximadamente 7,5 mediante la adición de 1 N NaOH. A la solución de pH ajustado se le añadieron 60 µL de A. niger de suspensión de catalasa (Sigma Aldrich, número de catálogo C-3515) y 150 mg de polvo de monoaminoxidasa (preparada por el método del Ejemplo 2) con la SEC NRO 4 en solución de fosfato potásico con pH 8,0. La solución amarilla pálida resultante se agitó en aire durante 24 horas, tiempo durante el cual se mantuvo el pH a 7,4 mediante adición controlada por retroalimentación de 1 N NaOH en porciones de 1-5 µL. La reacción se inactivó con 10 N NaOH para llevar el pH a aproximadamente 14, el producto se aisló mediante extracción en CDCl₃ y la conversión se analizó mediante ¹H-NMR, mostrando la formación de I, 3a, 4,5,6,6 a -hexahidrociclopenta [c] pirrol.

[0418] Cuando la monoaminoxidasa con SEC NRO. 4 utilizada en este ejemplo fue identificada en un cribado de alto rendimiento, el método de ensayo GC quiral del Ejemplo 5 mostró que oxida el octahidrociclopenta [c] pirrol a la deseada (3aR, 6aS)-imina (4). No se detectó el enantiómero (3aS, 6aR).

Ejemplo 22: Preparación de (1S, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta [c] pirrol-1 – carbonitrilo.

[0419] A un matraz de 3 bocas de 50 ml bajo aire se añadieron 25 ml de 100 mM de solución de fosfato de potasio con pH 8,0 y 400 mg de octahidrociclopenta [c] pirrol, 500 mg de Na₂S₂O₅ y el pH se ajustó a aproximadamente a 7,5 con NaOH 10N. Para la solución con pH ajustado se añadieron 30 µL de suspensión de catalasa A. niger (número de catálogo Sigma Aldrich, C-3515) y 300 mg de polvo de monoaminoxidasa (preparada por el método del Ejemplo 2 (SEC NRO 10 de solución de fosfato de potasio con pH 8,0). La solución amarilla pálida resultante se agitó en aire durante 24 horas, tiempo durante el cual se mantuvo el pH a 7,5 mediante adición controlada por retroalimentación de 1 N NaOH en porciones de 1-5 µL. Después de agitarse durante 48 horas, se añadieron 300 mg de NaCN a la mezcla de la reacción elevando el pH a ~ 9,9. Después de agitar a temperatura ambiente (aproximadamente 21 ° C) durante 1 hora adicional, la mezcla se extrajo con acetato de etilo. Después de la separación de fases y la evaporación del disolvente, se aislaron 316 mg de octahidrociclopenta [c] pirrol-1-carbonitrilo (82% de rendimiento). El análisis ¹H-NMR mostró ~ 90% (LS, 3aR, 6aS), "trans" y -10% del (1R, 3aR, 6aS) epímero, "cis". (¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) espectro : 8 3,95 (d, J = 6,6, cis aminonitrilo metino H), 3,62 (d, J = 1,2; trans aminonitrilo metino H), 3,15 (m, 1H), 2,71 (m, 2H), 2,62 (m, 1H) , 1,63-1,92 (m, 3H), 1,55 (m, 1H), 1,22-1,45 (m, 3H)).

Ejemplo 23: producción a escala preparativa de (3aR, 6aS)-I, 3a, 4,5,6,6 a-hexahidro-, ciclo-penta [c]-pirrol, Compuesto (4), y su correspondiente dímero, Compuesto (5).

[0420] A un matraz de 3 bocas de 3 l encamisado a 20°C y agitado a 300 rpm, se añadieron 500 ml de dH₂O y 20 ml de un 25% en peso octahidrociclopenta [c] pirrol de solución en agua de. El pH se ajustó a aproximadamente a 7,6 con H₃PO₄ concentrado para obtener una solución homogénea incolora. A esta solución se añadieron 2,0 ml de suspensión A. niger de catalasa (Sigma Aldrich, número de catálogo C-3515) y 5,0 g de polvo de monoamina

oxidasa del polipéptido de la SEC NRO: 16 (preparada por el método del Ejemplo 3) para obtener una solución de color amarillo pálido. El espacio superior del recipiente fue barrido con aire seco a aproximadamente 0,2 L / min. Se mantuvo el pH de la reacción a 7,5 por adición controlada por retroalimentación de 25% en peso de solución en agua de octahidrociclopenta [c] pirrol en 20-100 porciones de pL hasta que se fueron añadidos 380 ml. (La amina en solución neutra está protonada; la imina no. Un protón se libera por la reacción y debe ser neutralizado para mantener el pH. En este ejemplo, la propia amina es la base que se utiliza como reactivo de valoración para el pH-stat.) Después de haber añadido 380 ml del 25% en peso de solución en agua de octahidrociclopenta [c] pirrol, el pH se mantuvo mediante adición controlada por retroalimentación de 1 N NaOH para completar la reacción (correspondiente a los 5 g (45 mmol) iniciales del sustrato. Tras no se observarse más consumo de NaOH, se extrajo una alícuota de la suspensión, se filtró, y el sólido se secó al aire.

[0421] El espectro de ¹H-NMR del sólido disuelto en varios disolventes mostró proporciones variables de la imina (3aR, 6aS) octahidrociclopenta [c] pirrol (4) y su dímero (S) en solución. ¹H-NMR en DMSO-D₆ (300 MHz) mostró dímero y libre de imina no se detectó (espectro: 8 3,11 (t, J = 8,2; 1H), 2,45 (m, 1H), 2,33 (m, 1H), 1,85 (dd, J = 7,2, 8,1, 1H), 1,31-1,58 (m, 7H)). En CDC13 (300 MHz) , 1 H-NMR mostró una mezcla de imina y dímero (espectro: 8 3,22 (m, 1H), 2,65 (m, 1H), 2,30-2,40 (m, 2H), 1,89 (m, 1H) , 1,50-1,70 (m, 5H), 1,43 (m, 1H)). ¹H-NMR en 17% D3P04/D2O (300 MHz) mostró sólo el monómero imina protonado (espectro: 8 7.6 a 8.2 (br, 1H), 3.5-3.8 (br, 1H), 2.8-3.5 (br, 2H) , 2.2-2.8 (br, 1H), 0,5-1,7 (br, 6H)).

[0422] Al grueso de la mezcla de la reacción se le añadieron 100 ml de HC1 concentrado para obtener una suspensión de color amarillo con con pH ~ 0 (para romper el dímero de la imina protonada). La suspensión amarilla se centrifugó a 8000 a 4 ° C durante 10 minutos. El material sobrenadante de color amarillo resultante se separó por decantación y se devolvió al recipiente de reacción. La pasta blanca (sedimentada por la centrifugación) se resuspendió en 100 mM ml de dH2O y se filtró a través de papel de filtro. El residuo se lavó con dH2O (1 x 100 mM ml). Todas las soluciones acuosas ácidas así obtenidas, que contenían (3aS, 6aR) - I, 3a, 4,5,6,6 a-hexahidrociclopenta [c] pirrol se combinaron y se utilizaron directamente en la reacción de cianuración para el aminonitrilo.

[0423] Cuando la oxidasa monoamina con la SEC. NRO 16, utilizada en este ejemplo, se identificó en la selección de alto caudal, el ensayo de GC quiral del Ejemplo 5 mostró que se oxida el octahidrociclopenta [c] pirrol a la deseada (3aR, 6aS)-imina (4). No se detectó El enantiómero (3aS, 6aR).

Ejemplo 24: monoamina oxidasa catalizada desimetrización de pirrol a (3aS, 6aR)-I, 3a, 4,5,6,6 a-hexahidrociclopenta [c] pirrol y su correspondiente dímero en atmósfera de aire estático u oxígeno; aislamiento del producto a través de extracción.

[0424] A un matraz de 3 bocas de 3 l encamisado a 20 ° C y agitado a 300 rpm, se añadieron 500 ml de dH2O y 20 ml de un 25% del peso de octahidrociclopenta [c] pirrol de solución en agua. El pH se ajustó a aproximadamente 7,6 con H3P concentrado (> 4 para proporcionar una solución homogénea incolora a la que se añadieron 2,0 ml de suspensión de A. niger catalasa (Novozyme; "Catalyzyme 101") y 5,0 g de polvo de monoamina oxidasa del polipéptido de SEC NRO: 16, (preparado por el método del Ejemplo 3) para dar una solución de color amarillo pálido. El espacio de cabeza del recipiente fue barrido con aire seco aproximadamente a 0,2 L / min. Se mantuvo el pH de la reacción a 7,5 mediante la adición controlada de realimentación del 25% en peso de octahidrociclopenta [c] pirrol de solución en agua en partes de 20-100 pL hasta que llegar a 380 ml. (La amina en solución neutra está protonada; la imina no. Se libera un protón por la reacción y debe ser neutralizado para mantener el pH. En este ejemplo, la propia amina es la base que se utiliza como reactivo de valoración para el valor del pH...) Luego de añadir 380 ml del 25% del peso de ctahydrocyclopenta [c] pirrol de solución en agua, el pH se mantiene mediante la adición de NaOH 1 N para completar la reacción (correspondiente a la inicial de 5 g (45 mmol) del sustrato). Tras no observar más consumo de NaOH, se añadió 1,800 ml de MTBE a la mezcla de reacción heterogénea que a continuación se calentó a 45 ° C. Después de la filtración a través de Celite ®, la fase acuosa inferior se desechó y la fase orgánica superior se extrajo con ácido cítrico al 10%, y la solución acuosa ácida que contiene (3aS, 6aR)I, 3a, 4,5,6,6 ahexahidrociclopenta [c] pirrol se utilizó directamente en la preparación de (IR, 2S, 5S) - 6,6dimetil3azabicyclo [3.1.0] hexano2carboxílico de acuerdo con el método del Ejemplo 29.

Ejemplo 25: producción a escala preparativa del dímero de (3aR, 6aS) octahidrociclopenta [c] pirrol, Compuesto (3).

[0425] A un matraz de 3 bocas de 500 ml encamisado a 30 ° C en aire y agitado a 300 rpm, se añadieron 100 ml de dH2O y 2,0 ml de un 25% del peso de octahidrociclopenta [c] pirrol de solución en agua (0,5 g de sustrato). El pH se ajustó a aproximadamente 7,8 con concentrado. H3PO4 para dar una solución homogénea incolora. A esta solución se añadió 0,2 ml de suspensión de catalasa de A. niger (Novozyme "Catalyzyme 101) y 0,25 g de polvo de monoamina oxidasa del polipéptido de la SEC N ° 36 (preparado por el método del Ejemplo 3). El pH de la reacción comenzó a descender inmediatamente y el pH se mantuvo a pH 7,7 a través de retroalimentación controlada por la adición de 25% del peso de octahidrociclopenta [c] pirrol de solución en agua. Después de 2 horas, se añadieron unos 0,25 g adicionales del polvo de la monoamino oxidasa. El dímero de (3aR, 6aS) octahidrociclopenta [c] pirrol comenzó a precipitar a partir de la reacción y la mezcla de reacción se convirtió en una suspensión blanca durante la duración del experimento. Tras un período adicional de 2 horas (4 horas en total), el espacio de cabeza fue barrido

con ~ 0,6 / min ml de oxígeno y se mantuvo el barrido de oxígeno en la duración del experimento. Después de 24 horas de tiempo de reacción total, se añadieron 0,5 g adicionales de la monoamina oxidasa. Tras un tiempo de reacción total de 48,5 horas se había añadido un total de 32,3 ml del 25% del peso de octahidrociclopenta [c] de solución pirrol en agua (el total de sustrato reaccionado fue de 8,58 g). La mezcla de la reacción se transfirió a un matraz de una boca de 500 ml equipado con una cabeza corta de destilación de trayecto y la preparación se colocó en una manta de calefacción. Al calentar la manta de calentamiento a 160 ° C, el dímero de vapor comenzó a destilar al matraz receptor sumergido en un baño de hielo. La temperatura de la fase de vapor fue de ~ 96 ° C. Después de -30 minutos, -1 / 2 de la masa de reacción se había destilado y la temperatura de la fase de vapor era de ~ 98 ° C. La destilación se detuvo en ese punto. La suspensión en agua del sólido de color blanco en el matraz de recepción se filtró a través de un embudo de diafragma grueso y el sólido blanco se dejó secar al aire durante 2 horas proporcionando 7,17 g (rendimiento 84%) del dímero de (3aR, 6aS) octahidrociclopenta [c] pirrol

Ejemplo 26: desimetrización de monoamina oxidasa catalizada de octahidrociclopenta [c] pirrol a (3aS, 6aR) -1,3 a, 4,5,6,6 a- hexahidrociclopenta [c] pirrol y su correspondiente dímero en aire estático; separación del producto a través de la destilación al vapor.

[0426] A un matraz de 3 bocas de 3 l con camisa a 20 ° C y agitado a 300 rpm, se añadieron 500 ml de dffcO y 20 ml de un 25% en peso de solución en agua de octahidrociclopenta [c] pirrol. El pH se ajustó a aproximadamente 7,6 con H3PO4 concentrado para dar una solución homogénea incolora, a la que se añadieron 2,0 ml de suspensión de A. niger catalasa (Novozyme; "Catalyzyme 101") y 5,0 g de polvo de monoamina oxidasa del polipéptido de SEC NO : 16 (preparado por el método del Ejemplo 3) para dar una solución de color amarillo pálido. El espacio de cabeza del recipiente fue barrido con aire seco a aproximadamente 0,2 L / min. Se mantuvo el pH de la reacción a 7,5 mediante la adición controlada de realimentación del 25% en peso de octahidrociclopenta [c] pirrol de solución en agua en 20-100 porciones pL. El dímero de (3aR, 6aS) de octahidrociclopenta [c] pirrol precipitó a partir de la reacción y la mezcla de reacción se convirtió en una suspensión blanca. Después de añadir 380 ml del 25% en peso de octahidrociclopenta [c] de solución pirrol en agua, el producto se separó de la mezcla de reacción por medio de destilación al vapor (con temperatura de cabeza de ~ 98 ° C). El crisol receptor contenía una suspensión del dímero de (3aS, 6aR)-l, 3a, 4,5,6,6 a-hexahidrociclopenta [c] pirrol en agua. Se añadió 1,1 -1,2 equivalentes de HC1 concentrado al crisol receptor para romper el dímero y obtener una solución homogénea de (3aS, 6aR)-l, 3a, 4,5,6,6 a-hexahidrociclopenta [c] pirrol en agua. Esta solución se utilizó directamente para hacer (LS, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta [c] pirrol-l-carbonitrilo en el Ejemplo 27.

Ejemplo 27: Preparación de (lS, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta [c] pirrol-l-carbonitrilo

[0427] La solución ácida acuosa de (3aS, 6aR)-l, 3a, 4,5,6,6 a-hexahidrociclopenta [c] pirrol preparada en el Ejemplo 26 se enfrió a 0 ° C y se agitó a 300 rpm. A la solución enfriada a 0 ° C se añadió 50 g de NaCN en 100 ml de Cu-LO a 3 ml / min. (La neutralización de la solución de sal de hidrocloreuro por cianuro HCN generado in situ). 2 horas después del comienzo de la adición de NaCN, se añadió 1000 ml de tolueno (pre-enfriado en un baño de hielo) para obtener una mezcla bifásica, a la que se añadió una solución saturada de K2CO3 a una tasa de 10 ml / min hasta que el pH de la fase acuosa alcanzó 9,8. La fase acuosa inferior se retiró mediante una cánula y se trató con cloro (para destruir el cianuro restante) antes de la eliminación. La suspensión / emulsión orgánica superior se filtró a través de una cama de 20 g (-% "altura x ~ 3" de diámetro) de Celite ® 545 a temperatura ambiente (aproximadamente 21 ° C) durante unos 15 minutos para obtener ~ 1000 ml de fase orgánica incolora y ~ 300 ml de la fase acuosa amarilla junto con aproximadamente ~ 100 ml de una "fase de alfombra" (una capa intermedia dispuesta entre la fase orgánica superior y la fase acuosa inferior). La capa de Celite ® se lavó con tolueno 2 x 100 ml. Las soluciones se combinaron en un embudo de separación y la fase acuosa y la capa de alfombra se drenaron y se trataron con cloro para su eliminación. Una alícuota de la fase orgánica fue tomada de la fase orgánica y evaporada hasta ser desecada. Los análisis 1 H-RMN (300 MHz, CDCl3) mostraron (lS, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta [c] pirrol-]carbonitrilo ("trans") y el 1R su epímero ("cis") presente en relación de un -30: 1 ('H-RMN (300 MHz, CDCl3) espectro: 8 3,95 (d, J = 6,6, cis aminonitrilo metino H), 3,62 (d, J = 1,2; trans aminonitrilo metino H), 3,15 (m, 1H) , 2,71 (m, 2H), 2,62 (m, 1H), 1,63-1,92 (m, 3H), 1,55 (m, 1H), 1,22-1,45 (m, 3H)). La fase orgánica se enfrió a aproximadamente 0 ° C y se extrajo dos veces con 250 ml de HC1 concentrado (pre-enfriado en un baño de hielo) después de lo cual se produjo una separación limpia e inmediata de la fase. (Era necesario para pre-enfriar las soluciones de extracción ya que las extracciones fueron exotérmicas. La temperatura de las soluciones se elevó de - . 4 ° C a ~ temperatura ambiente). Los extractos concentrados combinados de HC1 (aproximadamente 600 ml en total) que contenían (LS, 3a, 6aS)-octahidrociclopenta [c] pirrol-l-carbonitrilo se combinaron y se utilizaron directamente para hacer (LS, 3a, 6aS)-octahidrociclopenta [c] pirrol -l-carboxílico clorhidrato de ácido en el Ejemplo 28.

Ejemplo 28: Preparación de (lS, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta [c] pirrol-l-carboxílico.

[0428] La solución de clorhidrato de pirrol-l-carbonitrilo (LS, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta [c] del Ejemplo 27 se calentó por reflujo durante 24 horas, después de lo cual, se destiló aproximadamente 300 ml de agua / HCl y la solución restante se enfrió hasta aproximadamente 50-60 ° C. A la solución tibia se añadió 500 ml de tolueno y el agua restante (aproximadamente 100-120 ml) se separó por destilación como un azeótropo de tolueno. Luego de haber eliminado toda el agua, la suspensión pesada de tolueno resultante de color marrón fuerte y amarillo pálido se

enfrió a temperatura ambiente (alrededor de 21 ° C). Los sólidos se recogieron en un embudo de filtro y se enjuagaron con tolueno (2 x 200 ml). Los sólidos de color tostado se secaron por aire durante 2 horas y se secaron adicionalmente al vacío durante la noche para obtener 159 g (72% de rendimiento global a partir de octahidrociclopenta [c] pirrol) de (1s, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta [c] pirrol-l-carboxílico clorhidrato en mezcla 1:1 con los coproductos NH₄Cl.

[0429] El ¹H-RMN de la mezcla de sal disuelta en DJO mostró una relación trans / cis (1S/1R) de aproximadamente 17:01. (¹H-RMN (300 MHz, DoO) espectro: 8 4,32 (d, J = 5,5; metino ácido cis-amino), 3,85 (d, J = 2,3; metino de trans-aminoácido), 3,50 (m, 1H) , 3,65-3,88 (m, 3H), 1,20-1,80 (m, 6H)).

Ejemplo 29: Preparación de (1 S, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta [c] pirrol-1 - t-butil éster de sal / ácido carboxílico ácido oxálico a partir de 01:01 (LS, 3aR, 6aS) -octahidrociclopenta [c] clorhidrato de ácido pirrol-1-carboxílico.

[0430] Paso 1: Para una botella de presión de paredes gruesas de vidrio de 1650 ml (Ace Glass, Inc., 8648-157) equipada con una barra de agitación magnética se cargaron 75 g (306,9 mmol) de la mezcla (LS, 3aR, 6aS) - octahidrociclopenta [c] pirrol-l-carboxílico clorhidrato / de cloruro de amonio preparada en el Ejemplo 28, 375 ml de diclorometano, y 497 ml de acetato de t-butilo. La mezcla resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C) para romper los agregados grandes a fin de proporcionar una suspensión libre de agitación. Esta suspensión se enfrió a una temperatura interna de 0°C usando un baño de salmuera-hielo y se añadió 75,4 ml (1,162 mmol) de ácido metanosulfónico gota a gota durante 15 minutos, durante los cuales la temperatura interna se elevó a 5°C. La botella de presión se selló y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta alcanzar la temperatura ambiente (aproximadamente 21°C) con agitación vigorosa durante 18 horas, durante las cuales la mezcla de reacción se convirtió en una suspensión de sales inorgánicas blancas en una solución ámbar. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se ventilo y destapó la botella de presión cuidadosamente. La mezcla se transfirió a un matraz de 3 L y se enfrió en un baño de hielo con agitación. Se añadió 400 ml de 50% (peso: peso) de NaOH en agua a la mezcla durante 35 minutos mientras se mantenía su temperatura por debajo de 20°C. La agitación se detuvo y se permitió separar las fases. La fase orgánica (~ 850 ml) se retiró a un recipiente separado. La fase acuosa restante y la capa de alfombra (pH 13, -800 ml) se extrajeron con 375 ml de diclorometano. Las fases orgánicas se combinaron (~ 1250 ml) y se lavaron con agua (2 x 225 ml). La fase orgánica resultante se filtró para eliminar una capa de trapo y cualquier material insoluble, y el disolvente se eliminó por evaporación a vacío giratorio para dar 48,3 g de aceite de color ámbar oscuro. El espectro de H RMN del aceite mostró (LS, 3aR, 6aS) - octahidrociclopenta [c] pirrol-l-carboxílico éster /butil.

[0431] Una segunda preparación siguiendo el mismo procedimiento dado fue de 50,6 g de aceite del éster (LS, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta trans-[c] pirrol-l-carboxílico terc-butil.

[0432] Paso 2: 97,9 g (463,3 mmol) de (1s, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta [c] pirrol-l-carboxilato de t-butilo a partir de las dos preparaciones de acuerdo con el Paso 1 se disolvieron en 750 ml de acetato de t-butilo y cargados en un 3 L matraz de cuatro bocas equipado con agitación superior mecánica, termómetro, embudo de adición y condensador de reflujo. Con agitación a temperatura ambiente (~ 21°C), Se añadió una solución de 44,0 g (488,6 mmol) de ácido oxálico en 750 ml 2-propanol gota a gota durante 37 minutos, aumentando la temperatura de la mezcla a 31°C. Los sólidos comenzaron a precipitar después de la adición de ~ 50 ml de la solución de ácido oxálico, dando como resultado una suspensión espesa tras la adición de 450 ml. Tras la adición de 500 ml de la solución de oxalato, los sólidos precipitados redisolvieron para proporcionar una solución de color amarillo oscuro. Los sólidos precipitaron de nuevo rápidamente después de la adición de 600 ml de la solución de ácido oxálico y persistieron hasta el final de la adición de ácido oxálico. Esta suspensión se calentó a continuación a 78°C para proporcionar una suspensión fina que se dejó enfriar pasivamente bajo agitación a temperatura ambiente (-21°C). Después de 16 horas desde el inicio del enfriamiento, los sólidos precipitados se recogieron por filtración y se lavaron sucesivamente con isopropanol (450 ml), acetato de isopropilo (450 ml), y metil t-butil metil éter (450 ml). Los sólidos se secaron en un horno de vacío (30°C, 25 "vacío, corriente de N₂) para proporcionar 118,1 g (LS, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta [c] pirrol-l-carboxílico terc-butil éster de ácido oxálico 1: 1 sal (64% de rendimiento a partir de (1s, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta [c] clorhidrato de ácido pirrol-l-carboxílico) como un polvo denso bronceado de flujo libre (99,7% de pureza por análisis GC), que exhibió los previstos H 'octahidrociclopenta-sal espectro de RMN-(1 S, 3aR, 6aS) [c] pirrol-1-carboxílico /-butil éster de ácido oxálico (1:1).

[0433] La recristalización de (1 S, 3aR, 6aS) - octahidrociclopenta [c] pirrol-l-carboxílico terc-butil éster de ácido oxálico (1:1) sal, el polvo de color canela de la Etapa 2 anterior (118,1 g, 391,9 mmol) e isopropanol (1950 ml) se cargaron en un matraz de cuello 3 de cuatro equipado con un agitador mecánico, un termómetro, y un condensador de reflujo. La suspensión se agitó y se calentó a 74°C para disolver completamente la sal, dando como resultado una solución de color amarillo. Se redujo la velocidad de la agitación y se dejó enfriar la solución pasivamente a temperatura ambiente (~ 21°C). Después de 20 horas desde el comienzo de la refrigeración, los sólidos precipitados se recogieron por filtración y se lavaron sucesivamente con isopropanol (1 L), acetato de isopropilo (1 L), y metil /-butil metil éter (1 L). Los sólidos se secaron en un horno de vacío (40°C, 28 "vacío, sin flujo) para proporcionar 110,45 g (LS, 3aR, 6aS)-octahidrociclopenta [c] pirrol-l-carboxílico terc-butil éster de ácido oxálico 1: 1 sal (rendimiento 59,7% a partir de (LS, 3a, 6aS)-octahidrociclopenta [c] clorhidrato de ácido pirrol-l-carboxílico) como agujas finas, de color blanquecino de 99,9% de pureza por análisis GC). El análisis por CG quiral mostró que sólo el

deseado (1 S, 3aR, 6aS)-estereoisómero. Su (2S)-epímero no se detectó.

LISTADO DE SECUENCIA

- 5 <110> Mijts, Benjamin Muley, Sheela Liang, Jack Newman, Lisa M. Zhang, Xiyun Lalonde, James Clay, Michael D. Zhu, Jun Gruber, John M. Colbeck, Jeffrey Munger, John D., Jr. Mavinhalli, Jagadeesh Sheldon, Roger
- <120> PROCESOS BIOCATALÍTICOS PARA LA PREPARACIÓN DE COMPUESTOS DE PROLINA BICÍCLICA FUSIONADA CONSIDERABLEMENTE PURA ESTEREOMÉRICAMENTE
- 10 <130> P056217EP
- <150> 61/075,243
- <151> 2008-06-24
- 15 <160> 36
- <210> 1
- <211> 1485
- 20 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Aspergillus Niger monoamida oxidasa (MAON)
- 25 <400> 1
- 30 atgaccagcc gcgacggcta tcagtgacc ccgaaacgg gtctgacca gggcgtaccg 60
- tccctgggtg tcatttcgcc gccgactaac atcgaagata ccgataagga cgggccttgg 120
- gatgtcattg tcattggggg cgggtattgt gggctgaccg caaccctgga ttaaccctc 180
- gcagggttca agacgctgct gctggaggcc cgtgatcgta ttggtggccg ctccctggagc 240
- agtaaatatt acggttaccg gtatgagatg ggtggcactt gggttcattg gcatcaatct 300
- cacgtgtggc gtgaaatcac gcgttataaa atgcacaacg cgctgtctcc atcatttaac 360
- 35 ttttcacgtg gcgtgaatca cttccaactg cgtaccaatc cgaccaccag tacgtacatg 420
- acgcacgaag cggagatga actgctgctg agcgcattgc ataaattcac caatgtcgac 480
- ggcactaatg gccgtacagt gttgcccgtt ccacatgata tgttttatgt gccggaattt 540
- cgcaagtatg acgaaatgct atattccgaa cgcatgacc agatccgcga cgaactgtct 600
- ttgaacgaac gctctagtgt agaggctttc attttattat gtagcgggtg caccctggaa 660
- 40 aactccagct ttggtgaatt tctgcattgg tgggcaatgt cgggttacac gtatcagggc 720
- tgtatggatt gtttaatctc ctataaattt aaggatggcc agagtgcgtt cgcgcgtcgc 780
- ttctgggaag aagccgctgg cactggccgt ctgggctatg tctttggtg tccggtgcgt 840
- tctgtggtga acgaacgcga cgcagcacgt gttaccgcac gtgacggtcg cgaattcgca 900
- gcgaaacggt ttggttgcac gattccgctg aacgtattga gtactattca gtttagcca 960
- 45 gcaactgtcca cggaaacgat ctccgctatg caggcaggcc atgttaacat gtgcacaaa 1020
- gtgcatgcgg aagtcgataa taaggatatg cgttcattga cgggtatcgc ctatccgttc 1080
- aacaaattat gctacgctat cggcgatggc acgaccccag cgggtaatac gcatctggtg 1140
- tgcttcggga cagacgcgaa tcatatccag ccggacgagg acgtgcgcga aacgttgaaa 1200
- gccgttggcc aactggcgcc tgggaactttc ggtgtcaaac gtctggtctt ccacaactgg 1260
- 50 gtaaaggatg aatttgcaa aggcgcgtgg ttcttcagcc gccaggcat ggtttcagag 1320
- tgctgcagg gtctgcgcga gaaacaccgt ggtgtcgtgt ttgcaaacct cgattgggcc 1380
- ttaggttggc gtagttttat cgatggtgct atcgaggagg gcacccgcgc agcgcgtggt 1440
- gtactggagg aactggggac caagcgcgag gtgaaggccc gcctg 1485
- 55 <210> 2
- <211> 495
- <212> PRT
- 60 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Aspergillus Niger monoamida oxidasa (MAON)
- 65 <400> 2

ES 2 438 576 T3

Met Thr Ser Arg Asp Gly Tyr Gln Trp Thr Pro Glu Thr Gly Leu Thr
 1 5 10
 Gln Gly Val Pro Ser Leu Gly Val Ile Ser Pro Pro Thr Asn Ile Glu
 20 25 30
 5 Asp Thr Asp Lys Asp Gly Pro Trp Asp Val Ile Val Ile Gly Gly Gly
 35 40 45
 Tyr Cys Gly Leu Thr Ala Thr Arg Asp Leu Thr Val Ala Gly Phe Lys
 50 55 60
 10 Thr Leu Leu Leu Glu Ala Thr Arg Asp Arg Ile Gly Gly Arg Ser Trp Ser
 65 70 75 80
 Ser Asn Ile Asp Gly Tyr Pro Tyr Glu Met Gly Gly Thr Trp Val His
 85 90 95
 Trp His Gln Ser His Val Trp Arg Glu Ile Thr Arg Tyr Lys Met His
 100 105 110
 15 Asn Ala Leu Ser Pro Ser Phe Asn Phe Ser Arg Gly Val Asn His Phe
 115 120 125
 Gln Leu Arg Thr Asn Pro Thr Thr Ser Thr Tyr Met Thr His Glu Ala
 130 135 140
 20 Glu Asp Glu Leu Leu Arg Ser Ala Leu His Lys Phe Thr Asn Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Thr Asn Gly Arg Thr Val Leu Pro Phe Pro His Asp Met Phe Tyr
 165 170 175
 Val Pro Glu Phe Arg Lys Tyr Asp Glu Met Ser Tyr Ser Glu Arg Ile
 180 185 190
 25 Asp Gln Ile Arg Asp Glu Leu Ser Leu Asn Glu Arg Ser Ser Leu Glu
 195 200 205
 Ala Phe Ile Leu Leu Cys Ser Gly Gly Thr Leu Glu Asn Ser Ser Phe
 210 215 220
 30 Gly Glu Phe Leu His Trp Trp Ala Met Ser Gly Tyr Thr Tyr Gln Gly
 225 230 235 240
 Cys Met Asp Cys Leu Ile Ser Tyr Lys Phe Lys Asp Gly Gln Ser Ala
 245 250 255
 Phe Ala Arg Arg Phe Trp Glu Glu Ala Ala Gly Thr Gly Arg Leu Gly
 260 265 270
 35 Tyr Val Phe Gly Cys Pro Val Arg Ser Val Val Asn Glu Arg Asp Ala
 275 280 285
 Ala Arg Val Thr Ala Arg Asp Gly Arg Glu Phe Ala Ala Lys Arg Leu
 290 295 300
 40 Val Cys Thr Ile Pro Leu Asn Val Leu Ser Thr Ile Gln Phe Ser Pro
 305 310 315 320
 Ala Leu Ser Thr Glu Arg Ile Ser Ala Met Gln Ala Gly His Val Asn
 325 330 335
 Met Cys Thr Lys Val His Ala Glu Val Asp Asn Lys Asp Met Arg Ser
 340 345 350
 45 Trp Thr Gly Ile Ala Tyr Pro Phe Asn Lys Leu Cys Tyr Ala Ile Gly
 355 360 365
 Asp Gly Thr Thr Pro Ala Gly Asn Thr His Leu Val Cys Phe Gly Thr
 370 375 380
 50 Asp Ala Asn His Ile Gln Pro Asp Glu Asp Val Arg Glu Thr Leu Lys
 385 390 395 400
 Ala Val Gly Gln Leu Ala Pro Gly Thr Phe Gly Val Lys Arg Leu Val
 405 410 415
 55 Phe His Asn Trp Val Lys Asp Glu Phe Ala Lys Gly Ala Trp Phe Phe
 420 425 430
 Ser Arg Pro Gly Met Val Ser Glu Cys Leu Gln Gly Leu Arg Glu Lys
 435 440 445
 His Arg Gly Val Val Phe Ala Asn Ser Asp Trp Ala Leu Gly Trp Arg
 450 455 460
 60 Ser Phe Ile Asp Gly Ala Ile Glu Glu Gly Thr Arg Ala Ala Arg Val
 465 470 475 480
 Val Leu Glu Glu Leu Gly Thr Lys Arg Glu Val Lys Ala Arg Leu
 485 490 495
 65

ES 2 438 576 T3

<210> 3
 <211> 1491
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> monoamina oxidasa variante
 <400> 3
 10
 atgaccagcc gcgacggcta tcagtggacc cggaaacgg gtctgacca gggcgtaccg 60
 tccctgggtg tcatttcgcc gccgactaac atcgaagata ccgataagga cgggccttgg 120
 gatgtcattg tcattggggg cgggtattgt gggctgaccg caaccctgga tttaacctgc 180
 15
 gcagggttca agacgctgct gctggaggcc cgtgatcgta ttgggtggccg ctccctggagc 240
 agtaaatattg acggttaccg gtatgagatg ggtggcactt gggttcattg gcatcaatct 300
 cacgtgtggc gtgaaatcac gcgttataaa atgcacaacg cgctgtctcc atcatttaac 360
 ttttcacgtg gctgfaatca cttccaactg cgtaccaatc cgaccaccag tacgtacatg 420
 acgcacgaag cggaggatga actgctgctg agcgcattgc ataaattcac caatgtcgac 480
 20
 ggcactaatg gccgtacagt gttgcccgtt ccacatgata tgttttatgt gccggaattt 540
 cgcaagtatg acgaaatgct atattccgaa cgcattgacc agatccgcga cgaactgtct 600
 ttgaacgaac gctctagttt agaggctttc attttattat gttagcggggg caccctggaa 660
 aactccagct ttgggtgaatt tctgcattgg tgggcaatgt cgggttacac gtatcagggc 720
 tgtatggatt gtttaatctc ctataaattt aaggatggcc agagtgcggt cgcgcgtcgc 780
 25
 ttctgggaag aagccgctgg cactggccgt ctgggctatg tctttggttg tccgggtgcgt 840
 tctgtggtga acgaacgcga cgcagtagct gttaccgcac gtgacggtcg cgaattcgca 900
 gcgaaacggt tggtttgac gattccgctg aacgtattga gtactattca gtttagccca 960
 gcaactgtcca cggaaacgcat ctccgctatg caggcaggcc atgttaacat gtgcacaaa 1020
 gtgcatgcgg aagtcgataa tcaggatatg cgttcatgga cgggtatcgc ctatccgttc 1080
 30
 aacaaattat gctacgctat cggcgatggc acgaccccag cgggtaatac gcatctgggtg 1140
 tgcttcggga cagacgcgaa tcataatccag ccggacgagg acgtgcgcga aacgttgaaa 1200
 gccgttggcc aactggcgcc tgggactttc ggtgtcaaac gtctggtctt ccacaactgg 1260
 gtaaaggatg aatttgccaa aggcgcgtgg ttcttcagcc gcccaggcat ggtttcagag 1320
 tgctgcagg gtctgcgcga gaaacaccgt ggtgtcgtgt ttgcaaactc cgattggggc 1380
 35
 ttaggttggc gtagttttat cgatggtgct atcgaggagg gcacccgcgc agcgcgtggt 1440
 gtactggagg aactggggac caagcgcgag gtgaaggccc gcctgtaatg a 1491
 <210> 4
 <211> 495
 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> monoamina oxidasa variante
 45
 <400> 4

ES 2 438 576 T3

	Met	Thr	Ser	Arg	Asp	Gly	Tyr	Gln	Trp	Thr	Pro	Glu	Thr	Gly	Leu	Thr
	1				5					10					15	
	Gln	Gly	Val	Pro	Ser	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Pro	Pro	Thr	Asn	Ile	Glu
				20					25					30		
5	Asp	Thr	Asp	Lys	Asp	Gly	Pro	Trp	Asp	Val	Ile	Val	Ile	Gly	Gly	Gly
		35						40					45			
	Tyr	Cys	Gly	Leu	Thr	Ala	Thr	Arg	Asp	Leu	Thr	Val	Ala	Gly	Phe	Lys
		50					55					60				
10	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Arg	Asp	Arg	Ile	Gly	Gly	Arg	Ser	Trp	Ser
	65					70					75					80
	Ser	Asn	Ile	Asp	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Glu	Met	Gly	Gly	Thr	Trp	Val	His
				85						90					95	
	Trp	His	Gln	Ser	His	Val	Trp	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Tyr	Lys	Met	His
				100					105					110		
15	Asn	Ala	Leu	Ser	Pro	Ser	Phe	Asn	Phe	Ser	Arg	Gly	Val	Asn	His	Phe
			115						120					125		
	Gln	Leu	Arg	Thr	Asn	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Tyr	Met	Thr	His	Glu	Ala
		130					135					140				
20	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	His	Lys	Phe	Thr	Asn	Val	Asp
	145					150					155					160
	Gly	Thr	Asn	Gly	Arg	Thr	Val	Leu	Pro	Phe	Pro	His	Asp	Met	Phe	Tyr
				165						170					175	
	Val	Pro	Glu	Phe	Arg	Lys	Tyr	Asp	Glu	Met	Ser	Tyr	Ser	Glu	Arg	Ile
				180					185						190	
25	Asp	Gln	Ile	Arg	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Asn	Glu	Arg	Ser	Ser	Leu	Glu
			195					200						205		
	Ala	Phe	Ile	Leu	Leu	Cys	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Phe
		210					215					220				
30	Gly	Glu	Phe	Leu	His	Trp	Trp	Ala	Met	Ser	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Gly
	225					230					235					240
	Cys	Met	Asp	Cys	Leu	Ile	Ser	Tyr	Lys	Phe	Lys	Asp	Gly	Gln	Ser	Ala
				245						250					255	
	Phe	Ala	Arg	Arg	Phe	Trp	Glu	Glu	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Arg	Leu	Gly
				260					265						270	
35	Tyr	Val	Phe	Gly	Cys	Pro	Val	Arg	Ser	Val	Val	Asn	Glu	Arg	Asp	Ala
			275					280						285		
	Val	Arg	Val	Thr	Ala	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Phe	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu
		290					295					300				
40	Val	Cys	Thr	Ile	Pro	Leu	Asn	Val	Leu	Ser	Thr	Ile	Gln	Phe	Ser	Pro
	305					310						315				320
	Ala	Leu	Ser	Thr	Glu	Arg	Ile	Ser	Ala	Met	Gln	Ala	Gly	His	Val	Asn
				325						330					335	
	Met	Cys	Thr	Lys	Val	His	Ala	Glu	Val	Asp	Asn	Gln	Asp	Met	Arg	Ser
				340						345					350	
45	Trp	Thr	Gly	Ile	Ala	Tyr	Pro	Phe	Asn	Lys	Leu	Cys	Tyr	Ala	Ile	Gly
			355					360						365		
	Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Ala	Gly	Asn	Thr	His	Leu	Val	Cys	Phe	Gly	Thr
		370					375						380			
50	Asp	Ala	Asn	His	Ile	Gln	Pro	Asp	Glu	Asp	Val	Arg	Glu	Thr	Leu	Lys
	385					390					395					400
	Ala	Val	Gly	Gln	Leu	Ala	Pro	Gly	Thr	Phe	Gly	Val	Lys	Arg	Leu	Val
				405						410					415	
	Phe	His	Asn	Trp	Val	Lys	Asp	Glu	Phe	Ala	Lys	Gly	Ala	Trp	Phe	Phe
				420					425					430		
55	Ser	Arg	Pro	Gly	Met	Val	Ser	Glu	Cys	Leu	Gln	Gly	Leu	Arg	Glu	Lys
			435					440						445		
	His	Arg	Gly	Val	Val	Phe	Ala	Asn	Ser	Asp	Trp	Ala	Leu	Gly	Trp	Arg
		450					455						460			
60	Ser	Phe	Ile	Asp	Gly	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Thr	Arg	Ala	Ala	Arg	Val
	465					470					475					480
	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Gly	Thr	Lys	Arg	Glu	Val	Lys	Ala	Arg	Leu	
				485						490					495	

65

ES 2 438 576 T3

<210> 5
 <211> 1491
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> monoamina oxidasa variante

<400> 5

10

```

atgaccagcc gcgacggcta tcagtggacc ccggaacggt gtctgacca gggcgtaccg 60
tccctgggtg tcatttcgcc gccgactaac atcgaagata ccgataagga cgggccttgg 120
gatgtcattg tcattggggg cgggtattgt gggctgaccg caaccctgta tttaacctgc 180
gcaggggtca agacgctgct gctggaggcc cgtgatcgta ttgggtggcc ctccctggagc 240
15 agtaaatattg acggttaccg gtatgagatg ggtggcactt gggttcattg gcatcaatct 300
cacgtgtggc gtgaaatcac gcgttataaa atgcacaacg cgctgtctcc atcatttaac 360
ttttcacgtg gcgtgaatca cttccaactg cgtaccaatc cgaccaccag tacgtacatg 420
acgcacgaag cggaggatga actgctgctg agcgcattgc ataaattcac caatgtcgcac 480
ggcactaatg gccgtacagt gttgccgttc ccacatgata tgttttatgt gccggaattt 540
20 cgcaagtatg acgaaatgct atattccgaa cgcattgacc agatccgcga cgaactgtct 600
ttgaacgaac gctctagttt agaggctttc attttattat gtagcgggtg caccctggaa 660
aactccagct ttgggtgaatt tctgcattgg tgggcaatgt cgggttacac gtatcagggc 720
tgatggatt gtttaatctc ctataaattt aaggatggcc agagtgcgtt cgcgcgtcgc 780
25 tctgggaag aagccgctgg cactggcctg ctgggctatg tctttggtg tccggtgctg 840
tctgtggatg acgaacgcga cgcagtactg gttaccgcac gtgacggtcg cgaattcgca 900
gcgaaacggt tggtttgac gattccgctg aacgtattga gttctgttca ttttagccca 960
ccactgtccc cgcaacgcat ggccgctgcg aacattggcc atgttaacca gtgcgtcaaa 1020
gtgcatgctg aagtcagttg tccggatatg cgttcatggt cgggtatctc ctatccgttc 1080
30 aacaaattag cctacgctat cggcgatggc acgaccccag cgggtaatac gcatattgtg 1140
tgcttcgggg gggcccataa tcatatccag ccggaagagg acgtggaagc aacgaagatg 1200
gccgttgaaa acatgtcccc tgggaatatg gatatcaaac gtctggtctt ccacaactgg 1260
tgcaaggatg aatttgccaa aggcgcgtgg ttcttcgcc ctccacagct gctgtcaaag 1320
agcctggatg aactgcgctg ccgtcacggt aatgtcctgt ttgcaaactc cgattggggc 1380
35 gtaggttggc gtagttttat cgatggtgct atcgaggagg gcacccgcgc agcggttact 1440
gtaattgagg aactgcgtcc tgcgcctgcg gtgcgttccc acctgtaatg a 1491
    
```

<210> 6
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> monoamina oxidasa variante

45

<400> 6

```

Met Thr Ser Arg Asp Gly Tyr Gln Trp Thr Pro Glu Thr Gly Leu Thr
1          5          10          15
50 Gln Gly Val Pro Ser Leu Gly Val Ile Ser Pro Pro Thr Asn Ile Glu
          20          25          30
Asp Thr Asp Lys Asp Gly Pro Trp Asp Val Ile Val Ile Gly Gly Gly
          35          40          45
55 Tyr Cys Gly Leu Thr Ala Thr Arg Asp Leu Thr Val Ala Gly Phe Lys
          50          55          60
Thr Leu Leu Leu Glu Ala Arg Asp Arg Ile Gly Gly Arg Ser Trp Ser
    
```

ES 2 438 576 T3

	65				70					75					80	
	Ser	Asn	Ile	Asp	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Glu	Met	Gly	Gly	Thr	Trp	Val	His
					85					90					95	
5	Trp	His	Gln	Ser	His	Val	Trp	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Tyr	Lys	Met	His
				100					105					110		
	Asn	Ala	Leu	Ser	Pro	Ser	Phe	Asn	Phe	Ser	Arg	Gly	Val	Asn	His	Phe
			115					120					125			
10	Gln	Leu	Arg	Thr	Asn	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Tyr	Met	Thr	His	Glu	Ala
			130				135					140				
	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	His	Lys	Phe	Thr	Asn	Val	Asp
	145					150					155				160	
	Gly	Thr	Asn	Gly	Arg	Thr	Val	Leu	Pro	Phe	Pro	His	Asp	Met	Phe	Tyr
				165						170					175	
15	Val	Pro	Glu	Phe	Arg	Lys	Tyr	Asp	Glu	Met	Ser	Tyr	Ser	Glu	Arg	Ile
				180					185					190		
	Asp	Gln	Ile	Arg	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Asn	Glu	Arg	Ser	Ser	Leu	Glu
			195					200					205			
20	Ala	Phe	Ile	Leu	Leu	Cys	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Phe
			210				215					220				
	Gly	Glu	Phe	Leu	His	Trp	Trp	Ala	Met	Ser	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Gly
	225					230					235				240	
	Cys	Met	Asp	Cys	Leu	Ile	Ser	Tyr	Lys	Phe	Lys	Asp	Gly	Gln	Ser	Ala
25				245						250					255	
	Phe	Ala	Arg	Arg	Phe	Trp	Glu	Glu	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Arg	Leu	Gly
				260					265					270		
	Tyr	Val	Phe	Gly	Cys	Pro	Val	Arg	Ser	Val	Val	Asn	Glu	Arg	Asp	Ala
			275					280					285			
30	Val	Arg	Val	Thr	Ala	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Phe	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu
			290				295					300				
	Val	Cys	Thr	Ile	Pro	Leu	Asn	Val	Leu	Ser	Ser	Val	His	Phe	Ser	Pro
	305					310						315				320
	Pro	Leu	Ser	Pro	Gln	Arg	Met	Ala	Ala	Ala	Asn	Ile	Gly	His	Val	Asn
35				325						330					335	
	Gln	Cys	Val	Lys	Val	His	Ala	Glu	Val	Ser	Cys	Pro	Asp	Met	Arg	Ser
			340					345					350			
	Trp	Ser	Gly	Ile	Ser	Tyr	Pro	Phe	Asn	Lys	Leu	Ala	Tyr	Ala	Ile	Gly
			355					360					365			
40	Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Ala	Gly	Asn	Thr	His	Ile	Val	Cys	Phe	Gly	Gly
			370				375					380				
	Ala	His	Asn	His	Ile	Gln	Pro	Glu	Glu	Asp	Val	Glu	Ala	Thr	Lys	Met
	385					390					395					400
45	Ala	Val	Glu	Asn	Met	Ser	Pro	Gly	Asn	Met	Asp	Ile	Lys	Arg	Leu	Val
				405						410					415	
	Phe	His	Asn	Trp	Cys	Lys	Asp	Glu	Phe	Ala	Lys	Gly	Ala	Trp	Phe	Phe
			420					425						430		
	Ala	Pro	Pro	Gln	Leu	Leu	Ser	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Cys	Arg
			435					440					445			
50	His	Gly	Asn	Val	Leu	Phe	Ala	Asn	Ser	Asp	Trp	Ala	Val	Gly	Trp	Arg
			450				455					460				
	Ser	Phe	Ile	Asp	Gly	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Thr	Arg	Ala	Ala	Val	Thr
	465					470					475					480
55	Val	Ile	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Ala	Pro	Ala	Val	Arg	Ser	His	Leu	
				485					490						495	

<210> 7

<211> 1491

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> monoamina oxidasa variante

65

<400> 7

ES 2 438 576 T3

```

atgaccagcc gcgacggcta tcagtggacc ccggaacgg gtctgacca gggcgtaccg 60
tccctgggtg tcatttcgcc gccgactaac atcgaagata ccgataagga cgggccttgg 120
gatgtcattg tcattggggg cgggtattgt gggctgaccg caaccctgga tttaacctgc 180
gcagggttca agacgctgct gctggaggcc cgtgatcgta ttgggtggccg ctcttgagc 240
5 agtaaatattg acggttaccg gtatgagatg ggtggcactt gggttcattg gcatcaatct 300
cacgtgtggc gtgaaatcac gcgttataaa atgcacaacg cgctgtctcc atcatttaac 360
ttttcacgtg gcgtgaatca cttccaactg cgtaccaatc cgaccaccag tacgtacatg 420
acgcacgaag cggaggatga actgctgctg agcgcattgc ataaattcac caatgtcgac 480
10 ggcactaatg gccgtacagt gttgccgttc ccacatgata tgttttatgt gccggaattt 540
cgcaagtatg acgaaatgtc atattccgaa cgcattgacc agatccgcga cgaactgtct 600
ttgaacgaac gctctagttt agaggctttc attttattat gtagcgggtg caccctggaa 660
aactccagct ttggtgaatt tctgcattgg tgggcaatgt cgggttacac gtatcagggc 720
tgtatggatt gtttaatctc ctataaattt aaggatggcc agagtgcgtt cgcgcgtcgc 780
15 ttctgggaag aagccgctgg cactggccgt ctgggctatg tctttggtt tccggtgctg 840
tctgtggtga acgaacgcga cgcagtacgt gttaccgcac gtgacggtcg cgaattcgca 900
gcgaaacggt ttggtttgcac gattccgctg aacgtattga gtactattca gtttagccca 960
gcactgtcca cggaacgcat ctccgctatg caggcaggcc atgttaacat gtgcaccaa 1020
gtgcatgceg aagtcgataa tcaggatag cgttcatgga cgggtatcgc ctatccgttc 1080
20 aacaaattat gctacgctat cggcgtatgg acgaccccag cgggtaatac gcatctggtg 1140
tgcttcggga cagacgcgaa tcatatccag ccggacgagg acgtgcgcga aacgttgaaa 1200
gccgttggcc aactggcgcc tgggactttc ggtgtcaaac gtctggtctt ccacaactgg 1260
gtaaaggatg aatttgcaa aggcgcgtgg ttcttcagcc gcccaggcat ggtttcagag 1320
tgctgcagg gtctgcgcga gaaacaccgt ggtgtcgtgt ttgcaaacctc cgattggggc 1380
25 ttaggttggc gtggttttat cgatggtgct atcgaggagg gcacccgcgc agcgcgtggt 1440
gtactggagg aactggggac caagcgcgag gtgaaggccc gcctgtaatg a 1491

```

```

<210> 8
<211> 495
30 <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> monoamina oxidasa variante
35
<400> 8

```

```

Met Thr Ser Arg Asp Gly Tyr Gln Trp Thr Pro Glu Thr Gly Leu Thr
1      5      10      15
40 Gln Gly Val Pro Ser Leu Gly Val Ile Ser Pro Pro Thr Asn Ile Glu
    20      25      30
    Asp Thr Asp Lys Asp Gly Pro Trp Asp Val Ile Val Ile Gly Gly Gly
    35      40      45
45 Tyr Cys Gly Leu Thr Ala Thr Arg Asp Leu Thr Val Ala Gly Phe Lys
    50      55      60
    Thr Leu Leu Leu Glu Ala Arg Asp Arg Ile Gly Gly Arg Ser Trp Ser
    65      70      75      80
    Ser Asn Ile Asp Gly Tyr Pro Tyr Glu Met Gly Gly Thr Trp Val His
    85      90      95
50 Trp His Gln Ser His Val Trp Arg Glu Ile Thr Arg Tyr Lys Met His
    100      105      110
    Asn Ala Leu Ser Pro Ser Phe Asn Phe Ser Arg Gly Val Asn His Phe
    115      120      125
55 Gln Leu Arg Thr Asn Pro Thr Thr Ser Thr Tyr Met Thr His Glu Ala
    130      135      140
    Glu Asp Glu Leu Leu Arg Ser Ala Leu His Lys Phe Thr Asn Val Asp
    145      150      155      160

```

ES 2 438 576 T3

Gly Thr Asn Gly Arg Thr Val Leu Pro Phe Pro His Asp Met Phe Tyr
 165 170 175
 5 Val Pro Glu Phe Arg Lys Tyr Asp Glu Met Ser Tyr Ser Glu Arg Ile
 180 185 190
 Asp Gln Ile Arg Asp Glu Leu Ser Leu Asn Glu Arg Ser Ser Leu Glu
 195 200 205
 Ala Phe Ile Leu Leu Cys Ser Gly Gly Thr Leu Glu Asn Ser Ser Phe
 210 215 220
 10 Gly Glu Phe Leu His Trp Trp Ala Met Ser Gly Tyr Thr Tyr Gln Gly
 225 230 235 240
 Cys Met Asp Cys Leu Ile Ser Tyr Lys Phe Lys Asp Gly Gln Ser Ala
 245 250 255
 Phe Ala Arg Arg Phe Trp Glu Glu Ala Ala Gly Thr Gly Arg Leu Gly
 260 265 270
 15 Tyr Val Phe Gly Cys Pro Val Arg Ser Val Val Asn Glu Arg Asp Ala
 275 280 285
 Val Arg Val Thr Ala Arg Asp Gly Arg Glu Phe Ala Ala Lys Arg Leu
 290 295 300
 20 Val Cys Thr Ile Pro Leu Asn Val Leu Ser Thr Ile Gln Phe Ser Pro
 305 310 315 320
 Ala Leu Ser Thr Glu Arg Ile Ser Ala Met Gln Ala Gly His Val Asn
 325 330 335
 25 Met Cys Thr Lys Val His Ala Glu Val Asp Asn Gln Asp Met Arg Ser
 340 345 350
 Trp Thr Gly Ile Ala Tyr Pro Phe Asn Lys Leu Cys Tyr Ala Ile Gly
 355 360 365
 Asp Gly Thr Thr Pro Ala Gly Asn Thr His Leu Val Cys Phe Gly Thr
 370 375 380
 30 Asp Ala Asn His Ile Gln Pro Asp Glu Asp Val Arg Glu Thr Leu Lys
 385 390 395 400
 Ala Val Gly Gln Leu Ala Pro Gly Thr Phe Gly Val Lys Arg Leu Val
 405 410 415
 Phe His Asn Trp Val Lys Asp Glu Phe Ala Lys Gly Ala Trp Phe Phe
 420 425 430
 35 Ser Arg Pro Gly Met Val Ser Glu Cys Leu Gln Gly Leu Arg Glu Lys
 435 440 445
 His Arg Gly Val Val Phe Ala Asn Ser Asp Trp Ala Leu Gly Trp Arg
 450 455 460
 40 Gly Phe Ile Asp Gly Ala Ile Glu Glu Gly Thr Arg Ala Ala Arg Val
 465 470 475 480
 Val Leu Glu Glu Leu Gly Thr Lys Arg Glu Val Lys Ala Arg Leu
 485 490 495

<210> 9

45 <211> 1491

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> monoamina oxidasa variante

<400> 9

atgaccagcc gcgacggcta tcagtggacc ccggaacgg gtctgaccga gggcgtaccg 60
 55 tcctgggtg tcatttcgcc gccgactaac atcgaagata ccgataagga cgggccttgg 120
 gatgtcattg tcattggggg cgggtattgt gggctgaccg caaccctgga ttttaaccgtc 180
 gcaggggttca agacgctgct gctggaggcc cgtgatcgta ttggtggccg ctctctggagc 240
 agtaaatattg acggttaccg gtatgagatg ggtggcactt gggttcattg gcatcaatct 300
 cacgtgtggc gtgaaatcac gcgttataaa atgcacaacg cgctgtctcc atcatttaac 360
 60 ttttcacgtg gcgtgaatca cttccaactg cgtaccaatc cgaccaccag tacgtacatg 420

ES 2 438 576 T3

5 acgcacgaag cggaggatga actgctgcgt agcgcattgc ataaattcac caatgtcgac 480
 ggcactaatg gccgtacagt gttgccgttc ccacatgata tgttttatgt gccggaattt 540
 cgcaagtatg acgaaatgtc atattccgaa cgcattgacc agatccgcga cgaactgtct 600
 ttgaacgaac gctctagttt agaggcttc attttattat gtagcgttg caccctggaa 660
 aactccagct ttggtgaatt tctgcattgg tgggcaatgt cgggttacac gtatcagggc 720
 tgtatggatt gtttaatctc ctataaattt aaggatggcc agagtgcgtt cgcgcgtcgc 780
 ttctgggaag aagccgctgg cactggccgt ctgggctatg tctttggtt tccgggtcgt 840
 tctgtggtga acgaacgcga cgcagtacgt gttaccgcac gtgacggtcg cgaattcgca 900
 10 gcgaaacgtt tggtttgac gattccgctg aacgtattga gttctgttca ttttagccca 960
 ccaactgtccc cgcaacgcat ggccgctcgc aacattggcc atgttaacca gtgcgtaaaa 1020
 gtgcatgcgg aagtcaagttg tccggatag cgttcatggt cgggtatctc ctatccgttc 1080
 aacaaatag cctacgctat cggcgtggc acgaccccag cgggtaatac gcatattgtg 1140
 tgcttcgggg gggcccataa tcatatccag ccggaagagg acgtggaagc aacgaagatg 1200
 15 gccgttgaaa acatgtcggc tgggaatag gatatacaaac gtctgttctt ccacaactgg 1260
 tgcaaggatg aatttgccaa aggcgcgtgg ttcttcgccc ctccacagct gctgtcaaag 1320
 agcctggatg aactgcgctg ccgtcacggt aatgtcctgt ttgcaaactc cgattggggc 1380
 ttaggttggc gtggttttat cgatggtgct atcaggaggg gcacccgcgc agcggttact 1440
 gtaattgagg aactgcgtcc tgcgctcgc gtgctgtccc acctgtaatg a 1491

20 <210> 10
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25 <220>
 <223> monoamina oxidasa variante
 <400> 10

30 Met Thr Ser Arg Asp Gly Tyr Gln Trp Thr Pro Glu Thr Gly Leu Thr
 1 5 10 15
 Gln Gly Val Pro Ser Leu Gly Val Ile Ser Pro Pro Thr Asn Ile Glu
 20 25 30
 Asp Thr Asp Lys Asp Gly Pro Trp Asp Val Ile Val Ile Gly Gly Gly
 35 35 40 45
 Tyr Cys Gly Leu Thr Ala Thr Arg Asp Leu Thr Val Ala Gly Phe Lys
 50 55 60
 Thr Leu Leu Leu Glu Ala Arg Asp Arg Ile Gly Arg Ser Trp Ser
 65 70 75 80
 40 Ser Asn Ile Asp Gly Tyr Pro Tyr Glu Met Gly Gly Thr Trp Val His
 85 90 95
 Trp His Gln Ser His Val Trp Arg Glu Ile Thr Arg Tyr Lys Met His
 100 105 110
 Asn Ala Leu Ser Pro Ser Phe Asn Phe Ser Arg Gly Val Asn His Phe
 115 120 125
 45 Gln Leu Arg Thr Asn Pro Thr Thr Ser Thr Tyr Met Thr His Glu Ala
 130 135 140
 Glu Asp Glu Leu Leu Arg Ser Ala Leu His Lys Phe Thr Asn Val Asp
 145 150 155 160
 50 Gly Thr Asn Gly Arg Thr Val Leu Pro Phe Pro His Asp Met Phe Tyr
 165 170 175
 Val Pro Glu Phe Arg Lys Tyr Asp Glu Met Ser Tyr Ser Glu Arg Ile
 180 185 190
 Asp Gln Ile Arg Asp Glu Leu Ser Leu Asn Glu Arg Ser Ser Leu Glu
 195 200 205
 55 Ala Phe Ile Leu Leu Cys Ser Gly Gly Thr Leu Glu Asn Ser Ser Phe
 210 215 220
 Gly Glu Phe Leu His Trp Trp Ala Met Ser Gly Tyr Thr Tyr Gln Gly
 225 230 235 240
 60 Cys Met Asp Cys Leu Ile Ser Tyr Lys Phe Lys Asp Gly Gln Ser Ala

ES 2 438 576 T3

					245					250				255		
	Phe	Ala	Arg	Arg	Phe	Trp	Glu	Glu	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Arg	Leu	Gly
				260					265					270		
5	Tyr	Val	Phe	Gly	Cys	Pro	Val	Arg	Ser	Val	Val	Asn	Glu	Arg	Asp	Ala
			275					280					285			
	Val	Arg	Val	Thr	Ala	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Phe	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu
		290					295					300				
	Val	Cys	Thr	Ile	Pro	Leu	Asn	Val	Leu	Ser	Ser	Val	His	Phe	Ser	Pro
		305				310					315					320
10	Pro	Leu	Ser	Pro	Gln	Arg	Met	Ala	Ala	Ala	Asn	Ile	Gly	His	Val	Asn
					325					330						335
	Gln	Cys	Val	Lys	Val	His	Ala	Glu	Val	Ser	Cys	Pro	Asp	Met	Arg	Ser
				340					345					350		
	Trp	Ser	Gly	Ile	Ser	Tyr	Pro	Phe	Asn	Lys	Leu	Ala	Tyr	Ala	Ile	Gly
			355					360						365		
15	Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Ala	Gly	Asn	Thr	His	Ile	Val	Cys	Phe	Gly	Gly
		370					375						380			
	Ala	His	Asn	His	Ile	Gln	Pro	Glu	Glu	Asp	Val	Glu	Ala	Thr	Lys	Met
		385				390					395					400
20	Ala	Val	Glu	Asn	Met	Ser	Pro	Gly	Asn	Met	Asp	Ile	Lys	Arg	Leu	Val
				405					410							415
	Phe	His	Asn	Trp	Cys	Lys	Asp	Glu	Phe	Ala	Lys	Gly	Ala	Trp	Phe	Phe
				420					425					430		
25	Ala	Pro	Pro	Gln	Leu	Leu	Ser	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Cys	Arg
				435				440						445		
	His	Gly	Asn	Val	Leu	Phe	Ala	Asn	Ser	Asp	Trp	Ala	Leu	Gly	Trp	Arg
		450					455					460				
	Gly	Phe	Ile	Asp	Gly	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Thr	Arg	Ala	Ala	Val	Thr
		465				470					475					480
30	Val	Ile	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Ala	Pro	Ala	Val	Arg	Ser	His	Leu	
					485					490					495	

<210> 11

<211> 1485

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> monoamina oxidasa variante

40

<400> 11

	atgaccagcc	gcgacggcta	tcagtggacc	ccggaaacgg	gtctgacca	gggcgaccg	60
	tccctgggtg	tcatttcgcc	gccgactaac	atcgaagata	ccgataagga	cgggccttgg	120
45	gatgtcattg	tcattggggg	cgggtattgt	gggctgaccg	caaccctgga	tttaaccgtc	180
	gcagggttca	agacgctgct	gctggaggcc	cgtgatcgta	ttggtggccg	ctcctggagc	240
	agtaaatattg	acggttacc	gtatgagatg	gggtggcactt	gggttcattg	gcatcaatct	300
	cacgtgtggc	gtgaaatcac	gcgttataaa	atgcacaacg	cgctgtctcc	atcatttaac	360
	ttttcacgtg	gcgtgaatca	cttccaactg	cgtaccaatc	cgaccaccag	tacgtacatg	420
50	acgcacgaag	cggaggatga	actgctgcgt	agcgcattgc	ataaattcac	caatgtcgac	480
	ggcactaatg	gccgtacagt	gttgccgttc	ccacatgata	tgttttatgt	gccggaattt	540
	cgcaagtatg	acgaaatgtc	atattccgaa	cgcattgacc	agatcccgga	cgaactgtct	600
	ttgaacgaac	gctctagttt	agaggctttc	attttattat	gtagcgggtg	caccctggaa	660
	aactccagct	ttggtgaatt	tctgcattgg	tgggcaatgt	cgggttacac	gtatcagggc	720
55	tgtatggatt	gtttaatctc	ctataaattt	aaggatggcc	agagtgcggt	cgcgcgtcgc	780
	ttctgggaag	aagccgctgg	cactggccgt	ctgggctatg	tctttggttg	tccggtgcgt	840
	tctgtgggtg	acgaacgcga	cgcagtacgt	gttaccgcac	gtgacggtcg	cgaattcgca	900
	gcgaaacggt	tggtttgcac	gattccgctg	aacgtattga	gttctgttca	ttttagccca	960
	ccactgtccc	cgcacgcgat	ggccgctgcg	aacattggcc	atgtaacca	gtgcgtcaaa	1020
60	gtgcatgcgg	aagtcagttg	tccggatatg	cgttcatggt	cgggtatctc	ctatccgttc	1080

ES 2 438 576 T3

```

aacaattag cctacgctat cggcgatggc acgaccccag cgggtaatac gcatattgtg 1140
tgccttgggg gggccataa tcatatccag ccggaagagg acgtggaagc aacgaagatg 1200
gccgttgaaa acatgtcgcc tgggaatatg gatatcaaac gtctggtctt ccacaactgg 1260
5 tgcaaggatg aatttgccaa aggcgcgtgg ttcttcgccc ctccacagct gctgtcaaag 1320
agcctggatg aactgcgctg ccgtcacggt aatgtcctgt ttgcaaactc cgattggggc 1380
ttaggttggc gtggttttat cgatggtgct atcgaggagg gcacccgcgc agcggttact 1440
gtaattgagg aactgcgtcc tgcgcctgcg gtgcgttccc acctg 1485

```

```

<210> 12
10 <211> 495
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
15 <223> monoamina oxidasa variante

    <400> 12

```

```

20 Met Thr Ser Arg Asp Gly Tyr Gln Trp Thr Pro Glu Thr Gly Leu Thr
    1 5 10 15
    Gln Gly Val Pro Ser Leu Gly Val Ile Ser Pro Pro Thr Asn Ile Glu
    20 25
    Asp Thr Asp Lys Asp Gly Pro Trp Asp Val Ile Val Ile Gly Gly Gly
    30 35
25 Tyr Cys Gly Leu Thr Ala Thr Arg Asp Leu Thr Val Ala Gly Phe Lys
    40 45
    Thr Leu Leu Leu Glu Ala Arg Asp Arg Ile Gly Gly Arg Ser Trp Ser
    50 55
30 Ser Asn Ile Asp Gly Tyr Pro Tyr Glu Met Gly Gly Thr Trp Val His
    60 65
    Trp His Gln Ser His Val Trp Arg Glu Ile Thr Arg Tyr Lys Met His
    70 75
    Asn Ala Leu Ser Pro Ser Phe Asn Phe Ser Arg Gly Val Asn His Phe
    80 85
35 Gln Leu Arg Thr Asn Pro Thr Thr Ser Thr Tyr Met Thr His Glu Ala
    90 95
    Glu Asp Glu Leu Leu Arg Ser Ala Leu His Lys Phe Thr Asn Val Asp
    100 105
40 Gly Thr Asn Gly Arg Thr Val Leu Pro Phe Pro His Asp Met Phe Tyr
    110 115
    Val Pro Glu Phe Arg Lys Tyr Asp Glu Met Ser Tyr Ser Glu Arg Ile
    120 125
    Asp Gln Ile Arg Asp Glu Leu Ser Leu Asn Glu Arg Ser Ser Leu Glu
    130 135
45 Ala Phe Ile Leu Leu Cys Ser Gly Gly Thr Leu Glu Asn Ser Ser Phe
    140 145
    Gly Glu Phe Leu His Trp Trp Ala Met Ser Gly Tyr Thr Tyr Gln Gly
    150 155
50 Cys Met Asp Cys Leu Ile Ser Tyr Lys Phe Lys Asp Gly Gln Ser Ala
    160 165
    Phe Ala Arg Arg Phe Trp Glu Glu Ala Ala Gly Thr Gly Arg Leu Gly
    170 175
    Tyr Val Phe Gly Cys Pro Val Arg Ser Val Val Asn Glu Arg Asp Ala
    180 185
55 Val Arg Val Thr Ala Arg Asp Gly Arg Glu Phe Ala Ala Lys Arg Leu
    190 195
    Val Cys Thr Ile Pro Leu Asn Val Leu Ser Ser Val His Phe Ser Pro
    200 205
60 Pro Leu Ser Pro Gln Arg Met Ala Ala Ala Asn Ile Gly His Val Asn
    210 215
    220 225
    230 235
    240 245
    250 255
    260 265
    270 275
    280 285
    290 295
    300 305
    310 315
    320 325
    330 335

```

ES 2 438 576 T3

Gln Cys Val Lys Val His Ala Glu Val Ser Cys Pro Asp Met Arg Ser
 340 345 350
 Trp Ser Gly Ile Ser Tyr Pro Phe Asn Lys Leu Ala Tyr Ala Ile Gly
 355 360 365
 5 Asp Gly Thr Thr Pro Ala Gly Asn Thr His Ile Val Cys Leu Gly Gly
 370 375 380
 Ala His Asn His Ile Gln Pro Glu Glu Asp Val Glu Ala Thr Lys Met
 385 390 395 400
 10 Ala Val Glu Asn Met Ser Pro Gly Asn Met Asp Ile Lys Arg Leu Val
 405 410 415
 Phe His Asn Trp Cys Lys Asp Glu Phe Ala Lys Gly Ala Trp Phe Phe
 420 425 430
 15 Ala Pro Pro Gln Leu Leu Ser Lys Ser Leu Asp Glu Leu Arg Cys Arg
 435 440 445
 His Gly Asn Val Leu Phe Ala Asn Ser Asp Trp Ala Leu Gly Trp Arg
 450 455 460
 Gly Phe Ile Asp Gly Ala Ile Glu Glu Gly Thr Arg Ala Ala Val Thr
 465 470 475 480
 20 Val Ile Glu Glu Leu Arg Pro Ala Pro Ala Val Arg Ser His Leu
 485 490 495

<210> 13

<211> 1491

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> monoamina oxidasa variante

30 <400> 13

atgaccagcc gcgacggcta tcagtggacc ccggaacgg gtctgacca gggcgtaccg 60
 tccctgggtg tcatttcgcc gccgactaac atcgaagata ccgataagga cgggccttgg 120
 gatgtcattg tcattggggg cgggtattgt gggctgaccg caaccctgta tttaacctgc 180
 35 gcagggttca agacgctgct gctggaggcc cgtgatcgta ttggtggccg ctctggagc 240
 agtaaatatt acggttaccg gtatgagatg ggtggcactt gggttcattg gcatcaatct 300
 cacgtgtggc gtgaaatcac gcgttataaa atgcacaacg cgctgtctcc atcatttaac 360
 ttttcacgtg gcgtgaatca cttccaactg cgtaccaatc cgaccaccag tacgtacatg 420
 acgcacgaag cggaggatga actgctgctg agcgcattgc ataaattcac caatgtcgcg 480
 40 ggcaactaat gccgtacagt gttgcccgtc ccacatgata tgttttatgt gccggaattt 540
 cgcaagtag acgaaatgct atattccgaa cgcattgacc agatccgca cgaactgtct 600
 ttgaacgaac gctctagtgt agaggcttc attttattat gtacggttg caccctggaa 660
 aactccagct ttggtgaatt tctgcattgg tgggcaatgt cgggttacac gtatcagggc 720
 tgtatggatt gttaaatctc ctataaattt aaggatggcc agagtgcgtt cgcgcgtcgc 780
 45 ttctgggaag aagccgctgg cactggccgt ctgggctatg tctttggtg tccggtgcgt 840
 tctgtggtga acgaacgca cgcagtacgt gttaccgcac gtgacggtcg cgaattcgca 900
 gcgaaacgtt tggtttgcac gattccgctg aacgtattga gttctgttca ttttagccca 960
 ccactgtccc cgcaacgcat ggccgctgcg aacattggcc atgttaacca gtgctcaaaa 1020
 gtgcatgcgg aagtcagttg tccggatatg cgttcatggt cgggtatctc ctatccgttc 1080
 50 aacaaattag cctgggctat cggcgatggc acgaccccag cgggtaatac gcatattgtg 1140
 tgcttcgggg gggcccataa tcatatccag ccggaagagg acgtggaagc aacgaagatg 1200
 gccgttgaaa acatgctgcc tgggaatatg gatcaaac gtctggtctt ccacaactgg 1260
 tgcaaggatg aatttgccaa aggcgcgtgg ttcttcgccc ctccacagct gctgtcaaaag 1320
 agcctggatg aactgcgctg ccgtcacggt aatgtcctgt ttgcaaactc cgattggggc 1380
 55 ttaggttggc gtggttttat cgatggtgct atcgaggagg gcaccgcgc agcggttact 1440
 gtaattgagg aactgcgtcc tgcgcctgcg gtgctgtccc acctgtaatg a 1491

<210> 14

<211> 495

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> monoamina oxidasa variante

65 <400> 14

ES 2 438 576 T3

	Met	Thr	Ser	Arg	Asp	Gly	Tyr	Gln	Trp	Thr	Pro	Glu	Thr	Gly	Leu	Thr
	1				5					10					15	
	Gln	Gly	Val	Pro	Ser	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Pro	Pro	Thr	Asn	Ile	Glu
				20					25					30		
5	Asp	Thr	Asp	Lys	Asp	Gly	Pro	Trp	Asp	Val	Ile	Val	Ile	Gly	Gly	Gly
			35					40					45			
	Tyr	Cys	Gly	Leu	Thr	Ala	Thr	Arg	Asp	Leu	Thr	Val	Ala	Gly	Phe	Lys
		50					55					60				
10	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Arg	Asp	Arg	Ile	Gly	Gly	Arg	Ser	Trp	Ser
	65				70						75					80
	Ser	Asn	Ile	Asp	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Glu	Met	Gly	Gly	Thr	Trp	Val	His
				85						90					95	
	Trp	His	Gln	Ser	His	Val	Trp	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Tyr	Lys	Met	His
				100					105					110		
15	Asn	Ala	Leu	Ser	Pro	Ser	Phe	Asn	Phe	Ser	Arg	Gly	Val	Asn	His	Phe
			115					120					125			
	Gln	Leu	Arg	Thr	Asn	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Tyr	Met	Thr	His	Glu	Ala
		130					135					140				
20	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	His	Lys	Phe	Thr	Asn	Val	Asp
	145					150					155					160
	Gly	Thr	Asn	Gly	Arg	Thr	Val	Leu	Pro	Phe	Pro	His	Asp	Met	Phe	Tyr
				165						170					175	
	Val	Pro	Glu	Phe	Arg	Lys	Tyr	Asp	Glu	Met	Ser	Tyr	Ser	Glu	Arg	Ile
				180					185					190		
25	Asp	Gln	Ile	Arg	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Asn	Glu	Arg	Ser	Ser	Leu	Glu
			195					200					205			
	Ala	Phe	Ile	Leu	Leu	Cys	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Phe
		210					215					220				
30	Gly	Glu	Phe	Leu	His	Trp	Trp	Ala	Met	Ser	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Gly
	225					230					235					240
	Cys	Met	Asp	Cys	Leu	Ile	Ser	Tyr	Lys	Phe	Lys	Asp	Gly	Gln	Ser	Ala
				245						250					255	
	Phe	Ala	Arg	Arg	Phe	Trp	Glu	Glu	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Arg	Leu	Gly
				260					265					270		
35	Tyr	Val	Phe	Gly	Cys	Pro	Val	Arg	Ser	Val	Val	Asn	Glu	Arg	Asp	Ala
			275					280					285			
	Val	Arg	Val	Thr	Ala	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Phe	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu
			290				295					300				
40	Val	Cys	Thr	Ile	Pro	Leu	Asn	Val	Leu	Ser	Ser	Val	His	Phe	Ser	Pro
	305					310					315					320
	Pro	Leu	Ser	Pro	Gln	Arg	Met	Ala	Ala	Ala	Asn	Ile	Gly	His	Val	Asn
				325							330				335	
	Gln	Cys	Val	Lys	Val	His	Ala	Glu	Val	Ser	Cys	Pro	Asp	Met	Arg	Ser
				340					345					350		
45	Trp	Ser	Gly	Ile	Ser	Tyr	Pro	Phe	Asn	Lys	Leu	Ala	Trp	Ala	Ile	Gly
			355					360					365			
	Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Ala	Gly	Asn	Thr	His	Ile	Val	Cys	Phe	Gly	Gly
		370					375					380				
50	Ala	His	Asn	His	Ile	Gln	Pro	Glu	Glu	Asp	Val	Glu	Ala	Thr	Lys	Met
	385					390					395					400
	Ala	Val	Glu	Asn	Met	Ser	Pro	Gly	Asn	Met	Asp	Ile	Lys	Arg	Leu	Val
				405						410					415	
	Phe	His	Asn	Trp	Cys	Lys	Asp	Glu	Phe	Ala	Lys	Gly	Ala	Trp	Phe	Phe
				420					425					430		
55	Ala	Pro	Pro	Gln	Leu	Leu	Ser	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Cys	Arg
			435					440					445			
	His	Gly	Asn	Val	Leu	Phe	Ala	Asn	Ser	Asp	Trp	Ala	Leu	Gly	Trp	Arg
		450					455					460				
60	Gly	Phe	Ile	Asp	Gly	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Thr	Arg	Ala	Ala	Val	Thr
	465					470					475					480
	Val	Ile	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Ala	Pro	Ala	Val	Arg	Ser	His	Leu	
					485					490					495	

ES 2 438 576 T3

<210> 15
 <211> 1491
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> monoamina oxidasa variante

<400> 15

10

```

atgaccagcc gcgacggcta tcagtggacc cggaaacgg gtctgaccga gggcgtaccg 60
tccctgggtg tcatttcgcc gccgactaac atcgaagata ccgataagga cgggccttgg 120
gatgtcattg tcattggggg cgggtattgt gggctgaccg caaccctgga tttaccctgc 180
gcagggttca agacgctgct gctggaggcc cgtgatcgta ttgggtggccg ctccctggagc 240
15 agtaaatattg acggttaccg gtatgagatg ggtggcactt gggttcattg gcatgaatct 300
cacgtgtggc gtgaaatcac gcgttataaa atgcacaacg cgctgtctcc atcatttaac 360
ttttcacgtg gcgatgaatca cttccaactg cgtaccaatc cgaccaccag tacgtacatg 420
acgcacgaag cggaggatga actgctgctg agcgcattgc ataaattcac caatgtcgac 480
ggcactaatg gccgtacagt gttgcccgtt ccacatgata tgttttatgt gccggaattt 540
20 cgcaagtatg acgaaatgct atattccgaa cgcattgacc agatcccgca cgaactgtct 600
ttgaacgaac gctctagttt agaggctttc attttattat gtagcgggtg caccctggaa 660
aactccagct ttgggtgaatt tctgcattgg tgggcaatgt cgggttacac gtatcagggc 720
tgatgggatt gtttaatctc ctataaattt aaggatggcc agagtgcgtt cgcgctcgc 780
tcttggaag aagccgctgg cactggccgt ctgggctatg tctttggtt tccggtcgt 840
25 tctgtggtga acgaacgcga cgcagtacgt gttaccgcac gtgacggtcg cgaattcgca 900
gcgaaacggt tggtttgac gattccgctg aacgtattga gttctgttca ttttagccca 960
cactgtccc cgcaacgcat ggcgctgctg aacattggcc atgttaacca gtgcgtcaaa 1020
gtgcatgcgg aagtcagttg tccggatatg cgttcatggt cgggtatctc ctatccgttc 1080
aacaattag cctgggctat cggcgtatgg acgaccccag cgggtaatac gcataattgtg 1140
30 tgcttcgggg gcgctcataa tcataccag ccggaagag acgtggaagc aacgaagatg 1200
gccgttgaaa acatgtcgc tgggaatatg gatatacaac gtctggtctt ccacaactgg 1260
tgcaaggatg aatttgccaa aggcgcttgg ttcttcgccc ctccacagct gctgtcaaag 1320
agcctggatg aactgcgctg ccgtcacggg aatgtcctgt ttgcaaactc cgattgggcc 1380
ttaggttggc gtggttttat tgatggtgct atcgaggagg gcacccgcgc agcggttact 1440
35 gtaattgagg aactgcgtcc tgcgcctgcg gtgcgttccc acctgtaatg a 1491
    
```

<210> 16
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> monoamina oxidasa variante

<400> 16

45

```

Met Thr Ser Arg Asp Gly Tyr Gln Trp Thr Pro Glu Thr Gly Leu Thr
1      5      10      15
50 Gln Gly Val Pro Ser Leu Gly Val Ile Ser Pro Pro Thr Asn Ile Glu
      20      25      30
    
```

ES 2 438 576 T3

	Asp	Thr	Asp	Lys	Asp	Gly	Pro	Trp	Asp	Val	Ile	Val	Ile	Gly	Gly	Gly
			35					40					45			
5	Tyr	Cys	Gly	Leu	Thr	Ala	Thr	Arg	Asp	Leu	Thr	Val	Ala	Gly	Phe	Lys
		50					55					60				
	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Arg	Asp	Arg	Ile	Gly	Gly	Arg	Ser	Trp	Ser
	65					70					75					80
10	Ser	Asn	Ile	Asp	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Glu	Met	Gly	Gly	Thr	Trp	Val	His
				85					90						95	
	Trp	His	Glu	Ser	His	Val	Trp	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Tyr	Lys	Met	His
				100					105					110		
	Asn	Ala	Leu	Ser	Pro	Ser	Phe	Asn	Phe	Ser	Arg	Gly	Val	Asn	His	Phe
			115					120					125			
15	Gln	Leu	Arg	Thr	Asn	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Tyr	Met	Thr	His	Glu	Ala
		130					135						140			
	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	His	Lys	Phe	Thr	Asn	Val	Asp
	145					150						155				160
20	Gly	Thr	Asn	Gly	Arg	Thr	Val	Leu	Pro	Phe	Pro	His	Asp	Met	Phe	Tyr
				165						170						175
	Val	Pro	Glu	Phe	Arg	Lys	Tyr	Asp	Glu	Met	Ser	Tyr	Ser	Glu	Arg	Ile
				180					185						190	
25	Asp	Gln	Ile	Arg	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Asn	Glu	Arg	Ser	Ser	Leu	Glu
			195					200					205			
	Ala	Phe	Ile	Leu	Leu	Cys	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Phe
		210					215						220			
	Gly	Glu	Phe	Leu	His	Trp	Trp	Ala	Met	Ser	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Gly
	225					230						235				240
30	Cys	Met	Asp	Cys	Leu	Ile	Ser	Tyr	Lys	Phe	Lys	Asp	Gly	Gln	Ser	Ala
				245						250					255	
	Phe	Ala	Arg	Arg	Phe	Trp	Glu	Glu	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Arg	Leu	Gly
				260					265						270	
35	Tyr	Val	Phe	Gly	Cys	Pro	Val	Arg	Ser	Val	Val	Asn	Glu	Arg	Asp	Ala
			275					280					285			
	Val	Arg	Val	Thr	Ala	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Phe	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu
		290					295					300				
	Val	Cys	Thr	Ile	Pro	Leu	Asn	Val	Leu	Ser	Ser	Val	His	Phe	Ser	Pro
	305					310						315				320
40	Pro	Leu	Ser	Pro	Gln	Arg	Met	Ala	Ala	Ala	Asn	Ile	Gly	His	Val	Asn
					325					330					335	
	Gln	Cys	Val	Lys	Val	His	Ala	Glu	Val	Ser	Cys	Pro	Asp	Met	Arg	Ser
				340						345					350	
45	Trp	Ser	Gly	Ile	Ser	Tyr	Pro	Phe	Asn	Lys	Leu	Ala	Trp	Ala	Ile	Gly
			355					360						365		
	Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Ala	Gly	Asn	Thr	His	Ile	Val	Cys	Phe	Gly	Gly
		370					375						380			
	Ala	His	Asn	His	Ile	Gln	Pro	Glu	Glu	Asp	Val	Glu	Ala	Thr	Lys	Met
						390						395				400
50	Ala	Val	Glu	Asn	Met	Ser	Pro	Gly	Asn	Met	Asp	Ile	Lys	Arg	Leu	Val
					405					410					415	
	Phe	His	Asn	Trp	Cys	Lys	Asp	Glu	Phe	Ala	Lys	Gly	Ala	Trp	Phe	Phe
				420					425						430	
55	Ala	Pro	Pro	Gln	Leu	Leu	Ser	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Cys	Arg
				435				440						445		
	His	Gly	Asn	Val	Leu	Phe	Ala	Asn	Ser	Asp	Trp	Ala	Leu	Gly	Trp	Arg
		450					455						460			
60	Gly	Phe	Ile	Asp	Gly	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Thr	Arg	Ala	Ala	Val	Thr
	465					470						475				480
	Val	Ile	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Ala	Pro	Ala	Val	Arg	Ser	His	Leu	
					485						490				495	

ES 2 438 576 T3

<210> 17
 <211> 1491
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> monoamina oxidasa variante

<400> 17

10

```

atgaccagcc gcgacggcta tcagtggacc ccggaacggt gtctgacca gggcgtaccg 60
tccctgggtg tcatttcgcc gccgactaac atcgaagata ccgataagga cgggccttgg 120
gatgtcattg tcattggggg cgggtattgt gggctgaccg caaccctgga ttaaccgtc 180
gcagggttca agacgctgct gctggaggcc cgtgatcgtg ttggtggccg ctccctggagc 240
15 agtaaatatt acggttaccg gtatgagatg ggtggcactt gggttcattg gcatgaatct 300
cacgtgtggc gtgaaatcac gcgttataaa atgcacaacg cgctgtctcc atcatttaac 360
ttttcacgtg gcgtgaatca cttccaactg cgtaccaatc cgcagaccag tacgtacatg 420
acgcacgaag cggaggatga actgctgctg agcgcattgc ataaattcac caatgtcgac 480
ggcactaatg gccgtacagt gttgccgttc ccacatgata tgttttatgt gccggaattt 540
20 cgcaagtatg acgaaatgtc atattccgaa cgcattgacc agatccgcga cgaactgtct 600
ttgaacgaac gctctagttt agaggctttc attttattat gtagcgggtg caccctggaa 660
aactccagct ttggtgaatt tctgcattgg tgggcaatgt cgggttacac gtatcagggc 720
tgtatggatt gtttaattct ctataaattt aaggatggcc agagtgcgtt cgcgcgtcgc 780
ttctgggaag aagccgctgg cactggccgt ctgggctatg tctttggttg tccggtgcgt 840
25 tctgtggtga acgaacgcga cgcagtacgt gttaccgcac gtgacggtcg cgaattcgca 900
gcgaaacggt tggtttgca c gattccgctg aacgtattga gttctgttca ttttagccca 960
ccactgtccc cgcaacgcat ggccgctgcg aacattggcc atgttaacca gtgctgcaaa 1020
gtgcatgcgg aagtcagttg tccggatatg cgttcattgt cgggtatctc ctatccgttc 1080
aacaatttag cctgggctat cggcgatggc acgaccccag cgggtaatac gcatattgtg 1140
30 tgcttcgggg gcgctcataa tcataatccag ccggaagagg acgtggaagc aacgaagatg 1200
gccgttgaaa acatgtcgcc tgggaatatg gatatacaac gtctgtgtct ccacaactgg 1260
tgcaaggatg aatttgccaa aggcgcttgg ttcttcgcc ctccacagct gctgtcaaa 1320
agcctggatg aactgcgctg ccgtcacggt aatgtcctgt ttgcaaactc cgattgggcc 1380
ttaggttggc gtggttttat tgatggtgct atcagaggagg gcacccgcgc agcggttact 1440
35 gtaattgagg aactgcgtcc tgcgcctgcg gtgcgttccc acctgtaatg a 1491
    
```

<210> 18
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> monoamina oxidasa variante

<400> 18

45

```

Met Thr Ser Arg Asp Gly Tyr Gln Trp Thr Pro Glu Thr Gly Leu Thr
1      5      10      15
Gln Gly Val Pro Ser Leu Gly Val Ile Ser Pro Pro Thr Asn Ile Glu
50      20      25      30
Asp Thr Asp Lys Asp Gly Pro Trp Asp Val Ile Val Ile Gly Gly Gly
35      40      45
Tyr Cys Gly Leu Thr Ala Thr Arg Asp Leu Thr Val Ala Gly Phe Lys
50      55      60
Thr Leu Leu Leu Glu Ala Arg Asp Arg Ile Gly Gly Arg Ser Trp Ser
55      65      70      75      80
Ser Asn Ile Asp Gly Tyr Pro Tyr Glu Met Gly Gly Thr Trp Val His
85      90      95
Trp His Glu Ser His Val Trp Arg Glu Ile Thr Arg Tyr Lys Met His
60      100      105      110
Asn Ala Leu Ser Pro Ser Phe Asn Phe Ser Arg Gly Val Asn His Phe
    
```


ES 2 438 576 T3

gatgtcattg tcattggggg cgggtattgt gggctgaccg caaccctgga ttttaaccgtc 180
 gcagggttca agacgctgct gctggaggcc cgtgatcgta ttgggtggccg ctctctggagc 240
 agtaaatattg acggttaccc gtatgagatg ggtggcactt gggttcattg gcatgaaatct 300
 5 cacgtgtggc gtgaaatcac gcgttataaa atgcacaacg cgctgtctcc atcatttaac 360
 ttttcacgtg gcggtgaatca cttccaactg cgtaccaatc cgcagaccag tacgtacatg 420
 acgcacgaag cggaggatga actgctgctg agcgcattgc ataaattcac caatgtcgcac 480
 ggactaatg gccgtacagt gttgccgttc ccacatgata tgttttatgt gccggaattt 540
 cgcaagtatg acgaaatgtc atattccgaa cgcattgacc agatccgcca cgaactgtct 600
 10 ttgaacgaac gctctagttt agaggctttc attttattat gtagcgggtg caccctggaa 660
 aactccagct ttggtgaatt tctgcattgg tgggcaatgt cgggttacac gtatcagggc 720
 tgtatggatt gtttaacttc ctataaattt aaggatggcc agagtgcgtt cgcgcgtcgc 780
 tctctgggaag aagccgctgg cactggcctg ctgggttatg tctttggtt tccggtcgt 840
 tctgtggtgg atgaacgcga cgcagtactg gttaccgcac gtgacggtcg cgaattcgca 900
 15 gcgaaacggt tggtttgac gattccgctg aacgtattga gttctgttca gtttagccca 960
 ccactgtccc cgcaacgcat ggccgctgag aacattggcc atgttaacca gtgctgcaaa 1020
 gtgcatgcgg aagtcagttg tccgcatatg cgttcatggt cgggtgtgtc ctatccgttc 1080
 acaaaattag cctgggctat cggcgatggc acgacccag cgggtaatac gcatattgtg 1140
 tgcttcgggg gcgctcataa tcatatccag ccggaagagg acgtggaagc aacgaagatg 1200
 20 gccgttgaaa acatgtcggc tgggaatatg gatatacaaac gtctggtctt ccacaactgg 1260
 tgcaaggatg aatttgccaa agcgcttgg ttcttcgccc ctccacagct cgtgtcaaaag 1320
 agcctgatg aactgcgctg ccgtcacggt aatgtcctgt ttgcaaactc cgattgggcc 1380
 ttaggttggc gtggttttat tgatggtgct atcgaggagg gcaccgcgc agcggttact 1440
 gtaattgagg aactgcgtcc tgcgctgagc gtgctgtccc acctgtaatg a 1491

25 <210> 20
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> monoamina oxidasa variante
 35 <400> 20

Met Thr Ser Arg Asp Gly Tyr Gln Trp Thr Pro Glu Thr Gly Leu Thr
 1 5 10 15
 Gln Gly Val Pro Ser Leu Gly Val Ile Ser Pro Pro Thr Asn Ile Glu
 20 25 30
 40 Asp Thr Asp Lys Asp Gly Pro Trp Asp Val Ile Val Ile Gly Gly Gly
 35 40 45
 Tyr Cys Gly Leu Thr Ala Thr Arg Asp Leu Thr Val Ala Gly Phe Lys
 50 55 60
 Thr Leu Leu Leu Glu Ala Arg Asp Arg Ile Gly Arg Ser Trp Ser
 65 70 75 80
 Ser Asn Ile Asp Gly Tyr Pro Tyr Glu Met Gly Gly Thr Trp Val His
 85 90 95
 Trp His Glu Ser His Val Trp Arg Glu Ile Thr Arg Tyr Lys Met His
 100 105 110
 50 Asn Ala Leu Ser Pro Ser Phe Asn Phe Ser Arg Gly Val Asn His Phe
 115 120 125
 Gln Leu Arg Thr Asn Pro Gln Thr Ser Thr Tyr Met Thr His Glu Ala
 130 135 140
 55 Glu Asp Glu Leu Leu Arg Ser Ala Leu His Lys Phe Thr Asn Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Thr Asn Gly Arg Thr Val Leu Pro Phe Pro His Asp Met Phe Tyr
 165 170 175
 Val Pro Glu Phe Arg Lys Tyr Asp Glu Met Ser Tyr Ser Glu Arg Ile
 180 185 190
 60 Asp Gln Ile Arg Asp Glu Leu Ser Leu Asn Glu Arg Ser Ser Leu Glu
 195 200 205

ES 2 438 576 T3

Ala Phe Ile Leu Leu Cys Ser Gly Gly Thr Leu Glu Asn Ser Ser Phe
 210 215 220
 5 Gly Glu Phe Leu His Trp Trp Ala Met Ser Gly Tyr Thr Tyr Gln Gly
 225 230 235 240
 Cys Met Asp Cys Leu Ile Ser Tyr Lys Phe Lys Asp Gly Gln Ser Ala
 245 250 255
 Phe Ala Arg Arg Phe Trp Glu Glu Ala Ala Gly Thr Gly Arg Leu Gly
 260 265 270
 10 Tyr Val Phe Gly Cys Pro Val Arg Ser Val Val Asp Glu Arg Asp Ala
 275 280 285
 Val Arg Val Thr Ala Arg Asp Gly Arg Glu Phe Ala Ala Lys Arg Leu
 290 295 300
 15 Val Cys Thr Ile Pro Leu Asn Val Leu Ser Ser Val Gln Phe Ser Pro
 305 310 315 320
 Pro Leu Ser Pro Gln Arg Met Ala Ala Ala Asn Ile Gly His Val Asn
 325 330 335
 Gln Cys Val Lys Val His Ala Glu Val Ser Cys Pro Asp Met Arg Ser
 340 345 350
 20 Trp Ser Gly Val Ser Tyr Pro Phe Asn Lys Leu Ala Trp Ala Ile Gly
 355 360 365
 Asp Gly Thr Thr Pro Ala Gly Asn Thr His Ile Val Cys Phe Gly Gly
 370 375 380
 25 Ala His Asn His Ile Gln Pro Glu Glu Asp Val Glu Ala Thr Lys Met
 385 390 395 400
 Ala Val Glu Asn Met Ser Pro Gly Asn Met Asp Ile Lys Arg Leu Val
 405 410 415
 Phe His Asn Trp Cys Lys Asp Glu Phe Ala Lys Gly Ala Trp Phe Phe
 420 425 430
 30 Ala Pro Pro Gln Leu Leu Ser Lys Ser Leu Asp Glu Leu Arg Cys Arg
 435 440 445
 His Gly Asn Val Leu Phe Ala Asn Ser Asp Trp Ala Leu Gly Trp Arg
 450 455 460
 35 Gly Phe Ile Asp Gly Ala Ile Glu Glu Gly Thr Arg Ala Ala Val Thr
 465 470 475 480
 Val Ile Glu Glu Leu Arg Pro Ala Pro Ala Val Arg Ser His Leu
 485 490 495

40 <210> 21
 <211> 2271
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> monoamina oxidasa MAOA
 <400> 21

50 atgggaagcc cctotctgta ttctgcccggt aaaacaaccc tggcgttggc agtcgcctta 60
 agtttcgcct ggcaagcgcc ggtatttgcc cacggtggtg aagcgcataat ggtgccaatg 120
 gataaaacgc ttaaagaatt tggtgccgat gtgcagtggg acgactacgc ccagctcttt 180
 accctgatta aagatggcgc gtacgtgaaa gtgaagcctg gtgcgcaaac agcaattggt 240
 aatggtcagc ctctggcact gcaagtaccg gtagtgatga aagacaataa agcctgggtt 300
 55 tctgacacct ttattaacga tgttttccag tccgggctgg atcaaacctt tcaggtagaa 360
 aagcgccctc acccaactta tgcgctaact gcgacgaaa ttaaacaggc cgttgaaatt 420
 gttaaagctt ccgcggactt caaaccaat acccgtttta ctgagatctc cctgctaccg 480
 ccagataaag aagctgtctg ggcgtttgcg ctggaaaaca aaccggttga ccagccgcgc 540
 aaagccgacg tcattatgct cgacggcaaa catatcatcg aagcggtggt ggatctgcaa 600
 aacaacaaac tgctctcctg gcaaccatt aaagacgccc acggtatggt gttgctggat 660
 60 gatttcgcca gtgtgcagaa cattattaac aacagtgaag aattgcccg tgccgtgaag 720
 aaacgcggta ttactgatgc gaaaaaagtg attaccacgc cgctgaccgt aggttatttc 780

ES 2 438 576 T3

```

gatggtaaag atggcctgaa acaagatgcc cggttgctca aagtcacag ctatcttgat 840
gtcggtgatg gcaactactg ggcacatccc atcgaaaacc tgggtggcggg cgttgattta 900
gaacagaaaa aaatcgtaa gattgaagaa ggcccggtag ttccgggtgcc aatgaccgca 960
5 cgccatttg atggcctgaa cgcgcttgct cggcagtta agcctatgca aatcattgag 1020
cctgaaggta aaaattacac cattactggc gatatgattc actggcggaa ctgggatttt 1080
cacctcagca tgaactctcg cgtcggggccg atgatctcca ccgtgactta taacgacaat 1140
ggcaccaaac gcaaagtcac gtacgaaggt tctctcggcg gcatgattgt gccttacggt 1200
gatcctgata ttggctggta ctttaaagcg tatctggact ctggtgacta cggtatgggc 1260
10 acgctaacct caccaattgc tcgtggtaaa gatgccccgt ctaacgcagt gtccttaat 1320
gaaaccatcg ccgactacac tggcgtgccg atggagatcc ctgcgcgctat cgcggtattt 1380
gaacgttatg ccggggccgga gtataagcat caggaaatgg gccagcccaa cgtcagtacc 1440
gaacgccggg agttagtggt gcgctggatc agtacagtgg gtaactatga ctacattttt 1500
gactggatct tccatgaaaa cggcactatt ggcatcgatg ccggtgctac gggcatcgaa 1560
15 gcggtgaaaag gtgttaaagc gaaaaccatg cacgatgaga cggcgaaaga tgacacgcgc 1620
tacggcacgc ttatcgatca caatatcgtg ggtactacac accaacatat ttataatttc 1680
cgcctcgatc tggatgtaga tggcgagaat aacagcctgg tggcgatgga cccagtggta 1740
aaaccgaata ctgccgggtg cccacgcacc agtaccatgc aagttaatca gtacaacatc 1800
ggcaatgaac aggatgccgc acagaaatth gatccgggca cgattcgtct gttgagtaac 1860
20 ccgaacaaaag agaaccgcat gggcaatccg gtttcctatc aaattattcc ttatgcaggt 1920
ggtactcacc cggtagcaaa aggtgcccag ttcgcgcggg acgagtggtat ctatcatcgt 1980
ttaagcttta tggacaagca gctctgggta acgcggtatc atcctggcga gcgcttcccg 2040
gaaggcaaat atccgaaccg ttctactcat gacaccggtc ttggacaata cagtaaggt 2100
aacgagtcgc tggacaacac cgacgcgctt gctcggatga ccaccggcac cacacatgtg 2160
25 gcccgcgccg aagagtggcc gattatgccg accgaaatggg tacatactct gctgaaacca 2220
tggaacttct ttgacgaaac gccaacgcta ggggcgctga agaaagataa g 2271

```

```

<210> 22
<211> 757
30 <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> monoamina oxidasa MAOA
35
    <400> 22

```

```

Met Gly Ser Pro Ser Leu Tyr Ser Ala Arg Lys Thr Thr Leu Ala Leu
1          5          10          15
40 Ala Val Ala Leu Ser Phe Ala Trp Gln Ala Pro Val Phe Ala His Gly
    20          25          30
    Gly Glu Ala His Met Val Pro Met Asp Lys Thr Leu Lys Glu Phe Gly
    35          40          45
45 Ala Asp Val Gln Trp Asp Asp Tyr Ala Gln Leu Phe Thr Leu Ile Lys
    50          55          60
    Asp Gly Ala Tyr Val Lys Val Lys Pro Gly Ala Gln Thr Ala Ile Val
    65          70          75          80
    Asn Gly Gln Pro Leu Ala Leu Gln Val Pro Val Val Met Lys Asp Asn
    85          90          95
50 Lys Ala Trp Val Ser Asp Thr Phe Ile Asn Asp Val Phe Gln Ser Gly
    100          105          110
    Leu Asp Gln Thr Phe Gln Val Glu Lys Arg Pro His Pro Leu Asn Ala
    115          120          125
55 Leu Thr Ala Asp Glu Ile Lys Gln Ala Val Glu Ile Val Lys Ala Ser
    130          135          140
    Ala Asp Phe Lys Pro Asn Thr Arg Phe Thr Glu Ile Ser Leu Leu Pro
    145          150          155          160
    Pro Asp Lys Glu Ala Val Trp Ala Phe Ala Leu Glu Asn Lys Pro Val
    165          170          175
60 Asp Gln Pro Arg Lys Ala Asp Val Ile Met Leu Asp Gly Lys His Ile
    180          185          190

```

ES 2 438 576 T3

	Ile	Glu	Ala	Val	Val	Asp	Leu	Gln	Asn	Asn	Lys	Leu	Leu	Ser	Trp	Gln
			195					200				205				
5	Pro	Ile	Lys	Asp	Ala	His	Gly	Met	Val	Leu	Leu	Asp	Asp	Phe	Ala	Ser
		210					215					220				
	Val	Gln	Asn	Ile	Ile	Asn	Asn	Ser	Glu	Glu	Phe	Ala	Ala	Ala	Val	Lys
		225				230					235					240
	Lys	Arg	Gly	Ile	Thr	Asp	Ala	Lys	Lys	Val	Ile	Thr	Thr	Pro	Leu	Thr
					245					250					255	
10	Val	Gly	Tyr	Phe	Asp	Gly	Lys	Asp	Gly	Leu	Lys	Gln	Asp	Ala	Arg	Leu
				260					265					270		
	Leu	Lys	Val	Ile	Ser	Tyr	Leu	Asp	Val	Gly	Asp	Gly	Asn	Tyr	Trp	Ala
			275					280					285			
15	His	Pro	Ile	Glu	Asn	Leu	Val	Ala	Val	Val	Asp	Leu	Glu	Gln	Lys	Lys
		290					295					300				
	Ile	Val	Lys	Ile	Glu	Glu	Gly	Pro	Val	Val	Pro	Val	Pro	Met	Thr	Ala
		305					310				315					320
	Arg	Pro	Phe	Asp	Gly	Arg	Asp	Arg	Val	Ala	Pro	Ala	Val	Lys	Pro	Met
					325					330					335	
20	Gln	Ile	Ile	Glu	Pro	Glu	Gly	Lys	Asn	Tyr	Thr	Ile	Thr	Gly	Asp	Met
				340					345					350		
	Ile	His	Trp	Arg	Asn	Trp	Asp	Phe	His	Leu	Ser	Met	Asn	Ser	Arg	Val
			355					360					365			
25	Gly	Pro	Met	Ile	Ser	Thr	Val	Thr	Tyr	Asn	Asp	Asn	Gly	Thr	Lys	Arg
			370				375					380				
	Lys	Val	Met	Tyr	Glu	Gly	Ser	Leu	Gly	Gly	Met	Ile	Val	Pro	Tyr	Gly
					390						395					400
	Asp	Pro	Asp	Ile	Gly	Trp	Tyr	Phe	Lys	Ala	Tyr	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp
					405					410					415	
30	Tyr	Gly	Met	Gly	Thr	Leu	Thr	Ser	Pro	Ile	Ala	Arg	Gly	Lys	Asp	Ala
				420					425					430		
	Pro	Ser	Asn	Ala	Val	Leu	Leu	Asn	Glu	Thr	Ile	Ala	Asp	Tyr	Thr	Gly
				435				440					445			
35	Val	Pro	Met	Glu	Ile	Pro	Arg	Ala	Ile	Ala	Val	Phe	Glu	Arg	Tyr	Ala
							455					460				
	Gly	Pro	Glu	Tyr	Lys	His	Gln	Glu	Met	Gly	Gln	Pro	Asn	Val	Ser	Thr
						470					475					480
	Glu	Arg	Arg	Glu	Leu	Val	Val	Arg	Trp	Ile	Ser	Thr	Val	Gly	Asn	Tyr
					485					490					495	
40	Asp	Tyr	Ile	Phe	Asp	Trp	Ile	Phe	His	Glu	Asn	Gly	Thr	Ile	Gly	Ile
				500					505					510		
	Asp	Ala	Gly	Ala	Thr	Gly	Ile	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Val	Lys	Ala	Lys
				515				520					525			
45	Thr	Met	His	Asp	Glu	Thr	Ala	Lys	Asp	Asp	Thr	Arg	Tyr	Gly	Thr	Leu
							535					540				
	Ile	Asp	His	Asn	Ile	Val	Gly	Thr	Thr	His	Gln	His	Ile	Tyr	Asn	Phe
						550					555					560
	Arg	Leu	Asp	Leu	Asp	Val	Asp	Gly	Glu	Asn	Asn	Ser	Leu	Val	Ala	Met
					565					570					575	
50	Asp	Pro	Val	Val	Lys	Pro	Asn	Thr	Ala	Gly	Gly	Pro	Arg	Thr	Ser	Thr
					580				585					590		
	Met	Gln	Val	Asn	Gln	Tyr	Asn	Ile	Gly	Asn	Glu	Gln	Asp	Ala	Ala	Gln
							600						605			
55	Lys	Phe	Asp	Pro	Gly	Thr	Ile	Arg	Leu	Leu	Ser	Asn	Pro	Asn	Lys	Glu
							615					620				
	Asn	Arg	Met	Gly	Asn	Pro	Val	Ser	Tyr	Gln	Ile	Ile	Pro	Tyr	Ala	Gly
						630						635				640
	Gly	Thr	His	Pro	Val	Ala	Lys	Gly	Ala	Gln	Phe	Ala	Pro	Asp	Glu	Trp
					645					650					655	
60	Ile	Tyr	His	Arg	Leu	Ser	Phe	Met	Asp	Lys	Gln	Leu	Trp	Val	Thr	Arg
				660					665						670	

ES 2 438 576 T3

Tyr His Pro Gly Glu Arg Phe Pro Glu Gly Lys Tyr Pro Asn Arg Ser
 675 680 685
 5 Thr His Asp Thr Gly Leu Gly Gln Tyr Ser Lys Asp Asn Glu Ser Leu
 690 695 700
 Asp Asn Thr Asp Ala Val Val Trp Met Thr Thr Gly Thr Thr His Val
 705 710 715 720
 Ala Arg Ala Glu Glu Trp Pro Ile Met Pro Thr Glu Trp Val His Thr
 725 730 735
 10 Leu Leu Lys Pro Trp Asn Phe Phe Asp Glu Thr Pro Thr Leu Gly Ala
 740 745 750
 Leu Lys Lys Asp Lys
 755

15 <210> 23
 <211> 2007
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> monoamina oxidasa putA

 <400> 23

25 atgggaacca ccaccatggg ggtaaagctg gacgacgcga cgcgtgagcg tattaagtct 60
 gccgcgacac gtatcgatcg cacaccacac tggttaatta agcaggcgat tttttcttat 120
 ctcgaacaac tggaaaacag cgataactctg ccggagctac ctgctgctgt ttctggcgcg 180
 gccaatgaga gcgatgaagc accgactccg gcagaggaac cacaccagcc attcctcgac 240
 30 tttgccgagc aaatattgcc ccagtcgggt tcccgcgccg cgatcaccgc ggcctatcgc 300
 cgcccggaaa ccgaagcggg ttctatgctg ctggaacaag cccgcctgcc gcagctcagt 360
 gctgaacagg cgcacaaact ggcgtatcag ctggccgata aactgcgtaa tcaaaaaaat 420
 gccagtggtc gcgcagggtt ggtccagggg ttattgcagg agttttcgtt gtcacgcgag 480
 gaagggcgtg cgctgatgtg tctggcggaa gcggtgttgc gtattcccga caaagccacc 540
 cgcgacgcgt taattcgcga caaaatcagc aacggtaact ggcagtcaca cattggctcg 600
 35 agcccgtcac tgtttgtaaa tgccgcacc tgggggctgc tgtttactgg caaactgggt 660
 tccaccata acgaagccag cctctcccgc tcgctgaacc gcattatcgg taaaagcggg 720
 gaaccgctga tccgcaaagg tgtggatatg gcgatgcgcc tgatgggtga gcagttcgtc 780
 actggcgaaa ccacgcgga agcgttagcc aatgcccga agctggaaga gaaaggtttc 840
 cgttactctt acgatatgct gggcgaagcc gcgctgacc cgcgagatgc acagcgtat 900
 40 atggtttcct atcagcaggc gattcacgcc atcggtaaag cgtctaaccg tcgtggcattc 960
 tatgaagggc cgggcatttc aatcaaactg tcggcgtgc atccgcgtta tagccgcgcc 1020
 cagtatgacc gggtaatgga agagctttac ccgctctga aatcactcac cctgctggcg 1080
 cgtcagtagc atattggtat caacattgac gccgaagagt ccgatcgcct ggagatctcc 1140
 ctgatctgct tggaaaaact ctgtttcgag ccggaactgg caggctggaa cggcatcggg 1200
 45 tttgttattc aggttatca aaaacgctgc ccggttggtga tcgattacct gattgatctc 1260
 gccaccgcga gccgtcgcg tctgatgatt cgcctggtga aaggcgcgta ctgggatagt 1320
 gaaattaagc gtgcgcagat ggacggcctt gaaggttatc cggtttatac ccgcaagggt 1380
 tataccgacg tttcttatct cgcctgtgcg aaaaagctgc tggcgggtgcc gaatctaatac 1440
 50 taccgcagc tgcgcagcga caacgcccat acgctggcgg cgatttatca actggcgggg 1500
 cagaactact acccgggtca gtacgagttc cagtgccctg atggtatggg cgagccactg 1560
 tatgagcagg tcaccgggaa agttgcccgc ggcaaactta accgtccgtg tcgtatztat 1620
 gctccggttg gcacacatga aacgctggtg gcgtatctgg tgcgtcgcct gctggaaaac 1680
 ggtgctaaca cctcgtttgt taaccgtatt gccgacacct ctttgccact ggatgaactg 1740
 55 gtcgccgatc cggtcactgc tgtagaaaaa ctggcgcaac aggaagggca aactggatta 1800
 ccgcatccga aaattcccct gccgcgcgat ctttacggtc acgggcgcga caactcggca 1860
 gggctggatc tcgctaacga acaccgctg gcctcgcctt cctctgccct gctcaatagt 1920
 gcaactgaaa aatggcaggc cttgccaatg ctggaacaac ccgtagcggc aggtgagatg 1980
 tcgcccgtta ttaaccctgc ggaaccg 2007

60 <210> 24
 <211> 669
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 438 576 T3

<223> monoamina oxidasa putA
<400> 24

5	Met	Gly	Thr	Thr	Thr	Met	Gly	Val	Lys	Leu	Asp	Asp	Ala	Thr	Arg	Glu
	1				5					10					15	
	Arg	Ile	Lys	Ser	Ala	Ala	Thr	Arg	Ile	Asp	Arg	Thr	Pro	His	Trp	Leu
				20					25					30		
	Ile	Lys	Gln	Ala	Ile	Phe	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gln	Leu	Glu	Asn	Ser	Asp
			35					40					45			
10	Thr	Leu	Pro	Glu	Leu	Pro	Ala	Leu	Leu	Ser	Gly	Ala	Ala	Asn	Glu	Ser
		50					55					60				
	Asp	Glu	Ala	Pro	Thr	Pro	Ala	Glu	Glu	Pro	His	Gln	Pro	Phe	Leu	Asp
	65					70					75				80	
	Phe	Ala	Glu	Gln	Ile	Leu	Pro	Gln	Ser	Val	Ser	Arg	Ala	Ala	Ile	Thr
15					85					90					95	
	Ala	Ala	Tyr	Arg	Arg	Pro	Glu	Thr	Glu	Ala	Val	Ser	Met	Leu	Leu	Glu
					100				105					110		
	Gln	Ala	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ala	Glu	Gln	Ala	His	Lys	Leu	Ala
					115			120					125			
20	Tyr	Gln	Leu	Ala	Asp	Lys	Leu	Arg	Asn	Gln	Lys	Asn	Ala	Ser	Gly	Arg
		130				135						140				
	Ala	Gly	Met	Val	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Glu	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Gln
	145					150					155					160
25	Glu	Gly	Val	Ala	Leu	Met	Cys	Leu	Ala	Glu	Ala	Leu	Leu	Arg	Ile	Pro
					165					170					175	
	Asp	Lys	Ala	Thr	Arg	Asp	Ala	Leu	Ile	Arg	Asp	Lys	Ile	Ser	Asn	Gly
					180				185					190		
	Asn	Trp	Gln	Ser	His	Ile	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Leu	Phe	Val	Asn	Ala
			195					200					205			
30	Ala	Thr	Trp	Gly	Leu	Leu	Phe	Thr	Gly	Lys	Leu	Val	Ser	Thr	His	Asn
							215					220				
	Glu	Ala	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Leu	Asn	Arg	Ile	Ile	Gly	Lys	Ser	Gly
	225					230					235					240
35	Glu	Pro	Leu	Ile	Arg	Lys	Gly	Val	Asp	Met	Ala	Met	Arg	Leu	Met	Gly
					245				250					255		
	Glu	Gln	Phe	Val	Thr	Gly	Glu	Thr	Ile	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Asn	Ala
					260				265					270		
	Arg	Lys	Leu	Glu	Glu	Lys	Gly	Phe	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Asp	Met	Leu	Gly
					275				280					285		
40	Glu	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Ala	Gln	Ala	Tyr	Met	Val	Ser	Tyr
					290			295					300			
	Gln	Gln	Ala	Ile	His	Ala	Ile	Gly	Lys	Ala	Ser	Asn	Gly	Arg	Gly	Ile
	305					310						315				320
45	Tyr	Glu	Gly	Pro	Gly	Ile	Ser	Ile	Lys	Leu	Ser	Ala	Leu	His	Pro	Arg
					325				330					335		
	Tyr	Ser	Arg	Ala	Gln	Tyr	Asp	Arg	Val	Met	Glu	Glu	Leu	Tyr	Pro	Arg
					340				345					350		
	Leu	Lys	Ser	Leu	Thr	Leu	Leu	Ala	Arg	Gln	Tyr	Asp	Ile	Gly	Ile	Asn
					355			360						365		
50	Ile	Asp	Ala	Glu	Glu	Ser	Asp	Arg	Leu	Glu	Ile	Ser	Leu	Asp	Leu	Leu
					370			375					380			
	Glu	Lys	Leu	Cys	Phe	Glu	Pro	Glu	Leu	Ala	Gly	Trp	Asn	Gly	Ile	Gly
	385					390					395					400
55	Phe	Val	Ile	Gln	Ala	Tyr	Gln	Lys	Arg	Cys	Pro	Leu	Val	Ile	Asp	Tyr
					405					410					415	

ES 2 438 576 T3

Leu Ile Asp Leu Ala Thr Arg Ser Arg Arg Arg Leu Met Ile Arg Leu
 420 425 430
 Val Lys Gly Ala Tyr Trp Asp Ser Glu Ile Lys Arg Ala Gln Met Asp
 435 440 445
 Gly Leu Glu Gly Tyr Pro Val Tyr Thr Arg Lys Val Tyr Thr Asp Val
 450 455 460
 Ser Tyr Leu Ala Cys Ala Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Asn Leu Ile
 465 470 475 480
 Tyr Pro Gln Phe Ala Thr His Asn Ala His Thr Leu Ala Ala Ile Tyr
 485 490 495
 Gln Leu Ala Gly Gln Asn Tyr Tyr Pro Gly Gln Tyr Glu Phe Gln Cys
 500 505 510
 Leu His Gly Met Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Gln Val Thr Gly Lys Val
 515 520 525
 Ala Asp Gly Lys Leu Asn Arg Pro Cys Arg Ile Tyr Ala Pro Val Gly
 530 535 540
 Thr His Glu Thr Leu Leu Ala Tyr Leu Val Arg Arg Leu Leu Glu Asn
 545 550 555 560
 Gly Ala Asn Thr Ser Phe Val Asn Arg Ile Ala Asp Thr Ser Leu Pro
 565 570 575
 Leu Asp Glu Leu Val Ala Asp Pro Val Thr Ala Val Glu Lys Leu Ala
 580 585 590
 Gln Gln Glu Gly Gln Thr Gly Leu Pro His Pro Lys Ile Pro Leu Pro
 595 600 605
 Arg Asp Leu Tyr Gly His Gly Arg Asp Asn Ser Ala Gly Leu Asp Leu
 610 615 620
 Ala Asn Glu His Arg Leu Ala Ser Leu Ser Ser Ala Leu Leu Asn Ser
 625 630 635 640
 Ala Leu Gln Lys Trp Gln Ala Leu Pro Met Leu Glu Gln Pro Val Ala
 645 650 655
 Ala Gly Glu Met Ser Pro Val Ile Asn Pro Ala Glu Pro
 660 665

35 <210> 25
 <211> 1110
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> monoamina oxidasa goxB 1

45 <400> 25
 atgaaaaggc attatgaagc agttgtcatt ggaggcggaa ttattggttc cgcgattgct 60
 tatcagttgg caaaagaaaa gaaaaacacc gcattgcttg aaagcggaac aatcggcggc 120
 agaacaacaa gcgccgcggc agggatgctt ggcgcccatg ccgagtgcga ggaacgggat 180
 50 gcgttttttg atttcgccat gcacagtcag cgtatgtacc gaggtcttgg agaggagcta 240
 tttgcattat ccggtatcga tattagaagg catgatggcg gtatgtttta gcttgcatc 300
 tccgaagaag acgtgtcacg cctcagacgg atggacgatt tggattctgt cagctggcat 360
 acaaaagaag aagtgtgga aaaagagccg tatacggcca gtgagattta cgggcgagc 420
 tttattcagg atgatgttca tgttgagcct tattttgtat gcaaggcata cgctaaatcg 480
 55 gctaaagcgc ttggtgcgga ttttttgag catactcctg ttctcgatgt gacatgtggc 540
 ggtgaatcca ttttgggtcaa aacagcgtcc ggtgacatgc atgcggatca tgtcgtgggt 600
 gccagcgggg tctggagcgg gatgtttttt aagcagctcg ggctgaatca gtcatttttt 660
 cctgtaaaag gagagtgcct gtctgttttg aatgatgaca ttccgctgac aaaaacactt 720
 tatcatgatc attgctatat cgtaccgaga aaaagcggca gactggttgt cggcgcgacg 780
 60 atgaagcctg gtgactggag cgagaaggcg gatcttggcg gacttcagtc ggttatggaa 840
 aaagcgaaaa cgatgtgcc ggcgattcag aatatgaagg ttgatcgttt ttggcgagg 900
 ctgcgtccgg ggacaaagga cggaaagcca tacattggca agcaccctca ggacagccgc 960
 attttatttg cggcgggcca tttcagaaac gggattctgc ttqctcctgc aacqqqtgct 1020
 ttaattggtg atctcattat gaataaagag gtcaaggcgg actggctgca cgcctttcga 1080
 65 attgatcgca aggaggcgg tcatgatatga 1110

ES 2 438 576 T3

<210> 26
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> monoamina oxidasa goxB 1

<400> 26

10

Met Lys Arg His Tyr Glu Ala Val Val Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Ile Ala Tyr Gln Leu Ala Lys Glu Lys Lys Asn Thr Ala Leu
 20 25 30
 15 Leu Glu Ser Gly Thr Ile Gly Gly Arg Thr Thr Ser Ala Ala Gly
 35 40 45
 Met Leu Gly Ala His Ala Glu Cys Glu Glu Arg Asp Ala Phe Phe Asp
 50 55 60
 Phe Ala Met His Ser Gln Arg Met Tyr Arg Gly Leu Gly Glu Glu Leu
 65 70 75 80
 Phe Ala Leu Ser Gly Ile Asp Ile Arg Arg His Asp Gly Gly Met Phe
 85 90 95
 Lys Leu Ala Phe Ser Glu Glu Asp Val Ser Arg Leu Arg Arg Met Asp
 100 110
 25 Asp Leu Asp Ser Val Ser Trp His Thr Lys Glu Glu Val Leu Glu Lys
 115 120 125
 Glu Pro Tyr Thr Ala Ser Glu Ile Tyr Gly Ala Ser Phe Ile Gln Asp
 130 135 140
 30 Asp Val His Val Glu Pro Tyr Phe Val Cys Lys Ala Tyr Ala Lys Ser
 145 150 155 160
 Ala Lys Ala Leu Gly Ala Asp Ile Phe Glu His Thr Pro Val Leu Asp
 165 170 175
 Val Thr Cys Gly Gly Glu Ser Ile Leu Val Lys Thr Ala Ser Gly Asp
 180 185 190
 35 Met His Ala Asp His Val Val Val Ala Ser Gly Val Trp Ser Gly Met
 195 200 205
 Phe Phe Lys Gln Leu Gly Leu Asn Gln Ser Phe Phe Pro Val Lys Gly
 210 215 220
 40 Glu Cys Leu Ser Val Trp Asn Asp Asp Ile Pro Leu Thr Lys Thr Leu
 225 230 235 240
 Tyr His Asp His Cys Tyr Ile Val Pro Arg Lys Ser Gly Arg Leu Val
 245 250 255
 Val Gly Ala Thr Met Lys Pro Gly Asp Trp Ser Glu Lys Ala Asp Leu
 260 265 270
 45 Gly Gly Leu Gln Ser Val Met Glu Lys Ala Lys Thr Met Leu Pro Ala
 275 280 285
 Ile Gln Asn Met Lys Val Asp Arg Phe Trp Ala Gly Leu Arg Pro Gly
 290 295 300
 50 Thr Lys Asp Gly Lys Pro Tyr Ile Gly Lys His Pro Gln Asp Ser Arg
 305 310 315 320
 Ile Leu Phe Ala Ala Gly His Phe Arg Asn Gly Ile Leu Leu Ala Pro
 325 330 335
 Ala Thr Gly Ala Leu Ile Gly Asp Leu Ile Met Asn Lys Glu Val Lys
 340 345 350
 55 Ala Asp Trp Leu His Ala Phe Arg Ile Asp Arg Lys Glu Ala Val Gln
 355 360 365
 Ile

60

ES 2 438 576 T3

<210> 27
 <211> 1110
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> monoamina oxidasa goxB 5

<400> 27

10

```

atgaaaaggc attatgaagc agtgggtgatt ggaggcggaa ttatcggttc cgcaattgct 60
tattatattg caaaggaaaa caaaaacacc gcattgtttg aaagcggaac aatgggcggc 120
agaacgacaa gtgccgctgc cggaatgctg ggcgcccatg ccgaatgcca ggaacgtgac 180
gcgttttttg atttcgccat gcacagccag cgtctgtaca aaggctcttg agaagagctt 240
15  tatgcattat ccgggtgtga tatcaggcag cataacggcg gtatgtttaa gcttgcattt 300
tctgaagaag atgtgctgca gctgagacag atggacgatt tggactctgt cagctgggat 360
tcaaaagaag aggtgttaga aaaagagccg tatgctctg gtgacatctt tggtgcatct 420
tttattcagg atgatgtgca tgtggagcct tattttgttt gcaaggcata tgtgaaagca 480
20  gcaaaaatgc ttggggcgga gatttttgag catacgcccg tcctgcatgt cgaacgtgac 540
ggtgaagccc tgtccatcaa gaccctagc ggagacgtat gggctaatac tgttgcgtt 600
gccagcgggg tgtggagcgg aatgtttttt aaacagcttg gactgaacaa tgcttttctc 660
cctgtaaaag gggagtgcct gtccgtttgg aatgatgata tcccgtgac aaaaacgctt 720
taccatgatc actgctatat cgtaccgaga aaaagcggca aactggttgt cggcgcgaca 780
25  atgaagccgg gggactggag tgaaacaccg gatcctggcg gattggaatc cgttatgaaa 840
aaagcaaaaa cgatgctgcc ggctatacag aatatgaagg tggatcgttt ttgggcggga 900
ctccgtccgg gaacaaagga tggaaaaccg tacatcggca gacatcctga ggacagccgt 960
attttatttg cggctggcca tttcagaaat gggatcctgc ttgctcccgc aacgggcgct 1020
ttgatcagtg atctcatcat gaataaagag gtcaaccaag actggctgca cgcattccga 1080
30  attgatcgca aggaggcggc tcagatatga                                     1110
    
```

<210> 28
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> monoamina oxidasa goxB 5

<400> 28

40

```

Met Lys Arg His Tyr Glu Ala Val Val Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly
1      5      10
45  Ser Ala Ile Ala Tyr Tyr Leu Ala Lys Glu Asn Lys Asn Thr Ala Leu
      20      25      30
Phe Glu Ser Gly Thr Met Gly Gly Arg Thr Thr Ser Ala Ala Ala Gly
      35      40      45
50  Met Leu Gly Ala His Ala Glu Cys Glu Glu Arg Asp Ala Phe Phe Asp
      50      55      60
Phe Ala Met His Ser Gln Arg Leu Tyr Lys Gly Leu Gly Glu Glu Leu
65      70      75      80
Tyr Ala Leu Ser Gly Val Asp Ile Arg Gln His Asn Gly Gly Met Phe
      85      90      95
55  Lys Leu Ala Phe Ser Glu Glu Asp Val Leu Gln Leu Arg Gln Met Asp
      100     105     110
Asp Leu Asp Ser Val Ser Trp Tyr Ser Lys Glu Glu Val Leu Glu Lys
      115     120     125
60  Glu Pro Tyr Ala Ser Gly Asp Ile Phe Gly Ala Ser Phe Ile Gln Asp
      130     135     140
    
```

ES 2 438 576 T3

5 Asp Val His Val Glu Pro Tyr Phe Val Cys Lys Ala Tyr Val Lys Ala
 145 150 155 160
 Ala Lys Met Leu Gly Ala Glu Ile Phe Glu His Thr Pro Val Leu His
 165 170 175
 Val Glu Arg Asp Gly Glu Ala Leu Ser Ile Lys Thr Pro Ser Gly Asp
 180 185 190
 Val Trp Ala Asn His Val Val Val Ala Ser Gly Val Trp Ser Gly Met
 195 200 205
 10 Phe Phe Lys Gln Leu Gly Leu Asn Asn Ala Phe Leu Pro Val Lys Gly
 210 215 220
 Glu Cys Leu Ser Val Trp Asn Asp Asp Ile Pro Leu Thr Lys Thr Leu
 225 230 235 240
 15 Tyr His Asp His Cys Tyr Ile Val Pro Arg Lys Ser Gly Lys Leu Val
 245 250 255
 Val Gly Ala Thr Met Lys Pro Gly Asp Trp Ser Glu Thr Pro Asp Leu
 260 265 270
 Gly Gly Leu Glu Ser Val Met Lys Lys Ala Lys Thr Met Leu Pro Ala
 275 280 285
 20 Ile Gln Asn Met Lys Val Asp Arg Phe Trp Ala Gly Leu Arg Pro Gly
 290 295 300
 Thr Lys Asp Gly Lys Pro Tyr Ile Gly Arg His Pro Glu Asp Ser Arg
 305 310 315 320
 25 Ile Leu Phe Ala Ala Gly His Phe Arg Asn Gly Ile Leu Leu Ala Pro
 325 330 335
 Ala Thr Gly Ala Leu Ile Ser Asp Leu Ile Met Asn Lys Glu Val Asn
 340 345 350
 Gln Asp Trp Leu His Ala Phe Arg Ile Asp Arg Lys Glu Ala Val Gln
 355 360 365
 30 Ile

<210> 29

<211> 1479

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> monoamina oxidasa MAO-2

40 <400> 29

atgaccaccc aggacggctg tcattatcac attaacgagg gtctgaccca tggcgtaccg 60
 tcccgtgcta aaatttatcc ggcggaacgc ctggcacagg gccagcagac cttggatacc 120
 45 attgtcattg gggccgggta tgctgggctg atcgagccc gtaatttagc cctgcaaggg 180
 aaacgtgtgg tgctgctgga ggcccgtgat cgtattggtg gccgcacctt taccagtgat 240
 attgacggtt acgggatga gatgggtggc aattggattc attgggtca acctcacgtg 300
 tatgctgaag tctcgcgta tagcatggcc aacgagctgg ttcatcaca ggactataca 360
 tatgaagagg gtaactactg ctgcactatg attcatggcg tcggtgggcg cctgacgcac 420
 caagaggagg aacatattgg ggaaaccgca atgtctattt tctgcaatgt cgacggtcag 480
 50 gatggcgtg ggggtgggccc gttcccacat aatgcgactc ataacgcgga ggcatttgcc 540
 acgtgggaca aagtgtcatg tcaggatcgc ctggaccaga tcaaagacaa actgtctccg 600
 ctgcaactgg cttttttaac gtctaccctg atgcatatta gcggtgcca caacgaagac 660
 gtcagcgtg ctgaattgct gcgttgggtg gcactgtgcg attaccgtaa ttcgggcatt 720
 acggattatg ggctgttgta taaattgaag tgtggccaga ctgggtggc gaaagccatc 780
 55 ttaacgaag gcgttctgct gggcaatctg cagtataaat ttagtgctcc ggtggttact 840
 attcgtgacg aaggcgcctc agtagaagtt accacacgtg gcggtcagca attcgtgagc 900
 aaaactgtga ttagcacgat tccgctgaac gatttgagtt ctattcagtt taccaccaca 960
 ctgcctacgg ggaaagtctt ggctgcgcgt caaggccatg ttaacaaggc caccaaacg 1020
 cattttgaag tcgaaggtac ggctatgcgt tcatggtcgg gtgtcgccta tccgtccaaa 1080
 60 qaaacaaatg acctataca caatgacctg acccaacaa ataatacaca tattattacc 1140
 ttcgggccag acccggaact gctggcgggc aaggacgtgg aaaaaattaa gggggccctg 1200
 acccatgtga aggatgccga agtcaaacgt attgtcttcc acgactggaa ccaggatgaa 1260
 ttttcccaag gcacgtgggc cgtctaccct ccaaaccttg ctacaaagta cctggataat 1320
 ctgcagaagc cagtcggtcg tatccatttt ccaagcgcg attgggcccga aggttggcgt 1380
 65 ggttttatcg atggtgctat cgagcagggc gtccgcgcat cgctggctgt atcgaaggaa 1440
 ctggcgagcc atcgcgcggc gccgaaacgt tcccacctg 1479

ES 2 438 576 T3

<210> 30
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> monoamina oxidasa MAO-2

<400> 30

10

Met Thr Thr Gln Asp Gly Cys His Tyr His Ile Asn Glu Gly Leu Thr
 1 5 10 15

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

15

Gln Gly Gln Gln Thr Leu Asp Thr Ile Val Ile Gly Ala Gly Tyr Ala
 35 40 45

Gly Leu Ile Ala Ala Arg Asn Leu Ala Leu Gln Gly Lys Arg Val Val
 50 55 60

20

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

Ile Asp Gly Tyr Gly Tyr Glu Met Gly Gly Asn Trp Ile His Trp Gly
 85 90 95

Gln Pro His Val Tyr Ala Glu Val Ser Arg Tyr Ser Met Ala Asn Glu
 100 105 110

25

Leu Val Ser Ser Gln Asp Tyr Thr Tyr Glu Glu Gly Asn Tyr Cys Ser
 115 120 125

Thr Met Ile His Gly Val Gly Gly Arg Leu Thr His Gln Glu Glu Glu
 130 135 140

30

His Ile Gly Glu Thr Ala Met Ser Ile Phe Cys Asn Val Asp Gly Gln
 145 150 155 160

Asp Gly Arg Gly Val Val Pro Phe Pro His Asn Ala Thr His Asn Ala
 165 170 175

Glu Ala Phe Ala Thr Trp Asp Lys Val Ser Cys Gln Asp Arg Leu Asp
 180 185 190

35

Gln Ile Lys Asp Lys Leu Ser Pro Leu Gln Leu Ala Phe Leu Thr Ser
 195 200 205

Thr Leu Met His Ile Ser Gly Ala Asn Asn Glu Asp Val Ser Val Ala
 210 215 220

40

Glu Leu Leu Arg Trp Trp Ala Leu Cys Asp Tyr Arg Asn Ser Gly Ile
 225 230 235 240

Thr Asp Tyr Gly Leu Leu Tyr Lys Leu Lys Cys Gly Gln Thr Gly Leu
 245 250 255

Ala Lys Ala Ile Phe Asn Glu Gly Val Leu Leu Gly Asn Leu Gln Tyr
 260 265 270

45

Lys Phe Ser Ala Pro Val Val Thr Ile Arg Asp Glu Gly Ala Ser Val
 275 280 285

Glu Val Thr Thr Arg Gly Gly Gln Gln Phe Arg Ala Lys Thr Val Ile
 290 295 300

50

Ser Thr Ile Pro Leu Asn Val Leu Ser Ser Ile Gln Phe Thr Pro Pro
 305 310 315 320

Leu Pro Thr Gly Lys Val Leu Ala Ala Arg Gln Gly His Val Asn Lys
 325 330 335

Ala Thr Lys Thr His Phe Glu Val Glu Gly Thr Ala Met Arg Ser Trp

ES 2 438 576 T3

5 Ser Gly Val 340 Ala Tyr Pro Ser Lys 345 Gly Gln Met Tyr Leu Tyr Gly Asp
 355 360 365
 Gly Leu Thr Pro Ala Gly Asn Thr His Ile Ile Ala Phe Gly Pro Asp
 370 375 380
 Pro Glu Leu Leu Ala Gly Lys Asp Val Glu Lys Ile Lys Gly Ala Leu
 385 390 395 400
 Thr His Val Lys Asp Ala Glu Val Lys Arg Ile Val Phe His Asp Trp
 405 410 415
 10 Asn Gln Asp Glu Phe Ser Gln Gly Thr Trp Ala Val Tyr Pro Asn
 420 425 430
 Phe Ala Thr Lys Tyr Leu Asp Asn Leu Gln Lys Pro Val Gly Arg Ile
 435 440 445
 15 His Phe Ala Ser Ala Asp Trp Ala Glu Gly Trp Arg Gly Phe Ile Asp
 450 455 460
 Gly Ala Ile Glu Gln Gly Val Arg Ala Ser Leu Ala Val Ser Lys Glu
 465 470 475 480
 20 Leu Ala Ser His Arg Ala Ala Pro Lys Arg Ser His Leu
 485 490

<210> 31
 <211> 1479
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Aspergillus oryzae monoamina oxidasa (MAO-3)
 30 <400> 31

atgaccagcc gcgacgggcta tcagtggacc gcgacaacgg gtctgcgcca gggcgtaccg 60
 tccattggtg tcatttcgcc gccgactaac gtcttaagta ccaactgagga ctgggatgct 120
 35 gttgtcgttg gggccgggta ttctgggctg accgcaagcc gtgatgcatg cctggcaggg 180
 ttgaaggtgc tgctgattga ggcccgtgat cgtattggtg gccgctcctg gagcagtaat 240
 attggcggtt acccgtttga gatgggtggc acttggctgt cttggggctca acctcacatt 300
 tggcgtgaag tctcgcgcta tcaaatgcgc agcagactgg aaccatgctt tgacttttca 360
 cgtggcgtga atcacttcga actgcgtacc ggttcgcagg gcagttcgat cttttcgcac 420
 40 ttagaggagg atgcaactgct ggctagcgca ttggaaaaat tcgtcgatgt cgacggcgct 480
 atgggccgctc aaattattcc gtaccacat gatgcgtttc ataaccggc agctcgccag 540
 tatgacgata tgcagcttt ggatcgctg aacgcgctgg cccagagcct gactccgaac 600
 gaacgcgctg ttttagagtc tttcatttta ttatgtagct gtggaccctt ggaaaccacc 660
 agcttttttg aattttctgca ttggtgggca ctgtgcgatt actcgtataa gggctgtctg 720
 45 cagcatttaa tctcctataa atttaagggt ggccagagtt cgttcgcatg taaattcttt 780
 cgtgaatccc tgcgactgg ccgtctgagc tatgccttta attctccggt gcagtcatt 840
 aacgaccatg gcgaccgtgt agttgttaaa acacgtgacg gtcgccaata ctcaggggca 900
 cgtttgatta gcacgattcc gctgaacgta ttgagttctg ttcattttag cccaccactg 960
 tccccgcaac gcatggccgc tgcgaacatt ggccatgta accagtgcgt caaagtgcatt 1020
 50 gcggaagtca gttgtccgga tatgcgttca tggtcgggta tctcctatcc gttcaacaaa 1080
 ttagcctacg ctatcggcga tggcagcacc ccagcgggta atacgcatat tgtgtgcttc 1140
 gggggggccc ataatcatat ccagccggaa gaggacgtgg aagcaacgaa gatggccgtt 1200
 gaaaacatgt cgcctgggaa tatggatatc aaacgtctgg tcttcacaa ctggtgcaag 1260
 gatgaattg ccaaaggcgc gtggttcttc gccctccac agctgctgtc aaagacctg 1320
 55 gatgaactgc gctgccgtca cggtaatgtc ctgtttgcaa actccgattg ggccgtaggt 1380
 tggcgtagtt ttatcgtatg tgctatcgag gagggcaccg gcgcagcggg tactgttaatt 1440
 gaggaactgc gtctcgcgcc tgcggtgctg tcccactg 1479

<210> 32
 <211> 493
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Aspergillus oryzae monoamina oxidasa (MAO-3)
 65 <400> 32

ES 2 438 576 T3

Met Thr Ser Arg Asp Gly Tyr Gln Trp Thr Ala Thr Thr Gly Leu Arg
 1 5 10 15
 Gln Gly Val Pro Ser Ile Gly Val Ile Ser Pro Pro Thr Asn Val Leu
 20 25 30
 5 Ser Thr Thr Glu Asp Trp Asp Val Val Val Val Gly Ala Gly Tyr Ser
 35 40 45
 Gly Leu Thr Ala Ser Arg Asp Ala Cys Leu Ala Gly Leu Lys Val Leu
 50 55 60
 10 Leu Ile Glu Ala Arg Asp Arg Ile Gly Gly Arg Ser Trp Ser Ser Asn
 65 70 75 80
 Ile Gly Gly Tyr Pro Phe Glu Met Gly Gly Thr Trp Leu Ser Trp Gly
 85 90 95
 Gln Pro His Ile Trp Arg Glu Val Ser Arg Tyr Gln Met Arg Ser Glu
 100 105 110
 15 Leu Glu Pro Cys Phe Asp Phe Ser Arg Gly Val Asn His Phe Glu Leu
 115 120 125
 Arg Thr Gly Ser Gln Gly Ser Ser Ile Phe Ser His Leu Glu Glu Asp
 130 135 140
 20 Ala Leu Leu Ala Ser Ala Leu Glu Lys Phe Val Asp Val Asp Gly Ala
 145 150 155 160
 Met Gly Arg Gln Ile Ile Pro Tyr Pro His Asp Ala Phe His Asn Pro
 165 170 175
 Ala Ala Arg Gln Tyr Asp Asp Met Ser Ala Leu Asp Arg Leu Asn Ala
 180 185 190
 25 Leu Ala Gln Ser Leu Thr Pro Asn Glu Arg Ala Val Leu Glu Ser Phe
 195 200 205
 Ile Leu Leu Cys Ser Cys Gly Thr Leu Glu Thr Thr Ser Phe Phe Glu
 210 215 220
 30 Phe Leu His Trp Trp Ala Leu Cys Asp Tyr Ser Tyr Lys Gly Cys Leu
 225 230 235 240
 Gln His Leu Ile Ser Tyr Lys Phe Lys Gly Gly Gln Ser Ser Phe Ala
 245 250 255
 Ile Lys Phe Phe Arg Glu Ser Leu Arg Thr Gly Arg Leu Ser Tyr Ala
 260 265 270
 35 Phe Asn Ser Pro Val Gln Ser Ile Asn Asp His Gly Asp Arg Val Val
 275 280 285
 Val Lys Thr Arg Asp Gly Arg Gln Tyr Ser Gly Ala Arg Leu Ile Ser
 290 295 300
 40 Thr Ile Pro Leu Asn Val Leu Ser Ser Val His Phe Ser Pro Pro Leu
 305 310 315 320
 Ser Pro Gln Arg Met Ala Ala Ala Asn Ile Gly His Val Asn Gln Cys
 325 330 335
 Val Lys Val His Ala Glu Val Ser Cys Pro Asp Met Arg Ser Trp Ser
 340 345 350
 45 Gly Ile Ser Tyr Pro Phe Asn Lys Leu Ala Tyr Ala Ile Gly Asp Gly
 355 360 365
 Thr Thr Pro Ala Gly Asn Thr His Ile Val Cys Phe Gly Gly Ala His
 370 375 380
 50 Asn His Ile Gln Pro Glu Glu Asp Val Glu Ala Thr Lys Met Ala Val
 385 390 395 400
 Glu Asn Met Ser Pro Gly Asn Met Asp Ile Lys Arg Leu Val Phe His
 405 410 415
 Asn Trp Cys Lys Asp Glu Phe Ala Lys Gly Ala Trp Phe Phe Ala Pro
 420 425 430
 55 Pro Gln Leu Leu Ser Lys Ser Leu Asp Glu Leu Arg Cys Arg His Gly
 435 440 445
 Asn Val Leu Phe Ala Asn Ser Asp Trp Ala Val Gly Trp Arg Ser Phe
 450 455 460
 60 Ile Asp Gly Ala Ile Glu Glu Gly Thr Arg Ala Ala Val Thr Val Ile
 465 470 475 480
 Glu Glu Leu Arg Pro Ala Pro Ala Val Arg Ser His Leu
 485 490

65

ES 2 438 576 T3

<210> 33
 <211> 1476
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> monoamina oxidasa MAO-4

<400> 33

10

```

atgaccagcc gcgacggcta tcagtggacc gcgaaaacgg gtctgggtcca gggcgtaccg 60
tccattagtg tcatttcgcc gccgactaac atcagccctg aaagtcgtca gtatgatgtc 120
gttgtcgttg gggccgggta ttctgggctg accgcagccc gtgatacatg cctggcaggg 180
ttgaagggtg tgctgctgga ggcccgtgat cgtattgggtg gccgctcctg gagcagtgat 240
15 attggcggtt acccgtttga gatgggtggc acttgggttc attgggggtca acctcacgtg 300
tggcgtgaaa tctcgcgtta tcaaatgcgc aacgagctgg aatcatcatt tgacttttca 360
cgtggcgtga atcacttcga actgcgtacc aatcagggcc ctgcatcatg gtcgcacaaa 420
gaggaggatg aactgctggc tgccgcattg cataaattcg tcgatgtcga cggcgatctg 480
ggccgtcgtg cggtgccgtt cccacatgat tcgtttcatg tgccggaagc tcgccagtat 540
20 gaccaaagt cagctaaaga tcgcatgacc cagatcgccg acacagtgtc tccgcgcgaa 600
cgcgctgctt tagagtcttt cgttttatta tgtagcgggtg gcaccctggc aaccaccagc 660
ttttttgaat ttctgcattg gtgggcaactg tgccggttact cgtatcaggg ctgtctggat 720
gctttaatct cctataaatt taagcgtggc cagagttcgt tcgcgctgcg cttctttcgt 780
25 gaagccctga gcaactggcaa tctgagctat gcctttaatt ctccgattca gtctattgat 840
gaccaaggcg ccaaagtagt tgttaccaca cgtgaaggtc accggttacgc aggggcacgt 900
ttgattagca cgattccgct gaacgtattg aatactgtta cgattagccc accactgggc 960
acgcaacgca ccgccgctgc gaacacagggc catgttaacc agtgcgtaa agtgcagtcg 1020
gaaatcgcta gtcgtgatat gcgttcatgg acgggtatct cctatccggt caacaaatta 1080
30 tgctacgcta tcggcgatgg cacgacccca gcgggtaata cgcatattgt gtgcttcggg 1140
gggagccata atcatalcca gccggaagag gacattaaac aaacgaagac agccggtgaa 1200
tcaactgtcgc ctgggaatat ggatatcaaa cgtctgggtc tccacaactg gtcaaaggat 1260
gaatttgcca aaggcgcgtg gttcttcagc cctccagaaa tgctgtcaac gagcctggag 1320
gctctgcgca gccgtcacgg taatgtcgtg ttggcaaac ccgattgggc cttaggttgg 1380
35 cgtagtttta tcgatggtgc tatcgaggag ggcacccgcg cagcagtgac tgtagtggag 1440
gaactgcgtc ctcagcctgc ggtgcgtgaa cacctg 1476
    
```

<210> 34
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> monoamina oxidasa MAO-4

45

<400> 34

50

```

Met Thr Ser Arg Asp Gly Tyr Gln Trp Thr Ala Glu Thr Gly Leu Val
1          5          10          15
Gln Gly Val Pro Ser Ile Ser Val Ile Ser Pro Pro Thr Asn Ile Ser
20          25          30
Pro Glu Ser Arg Gln Tyr Asp Val Val Val Val Gly Ala Gly Tyr Ser
    
```


ES 2 438 576 T3

<210> 35
 <211> 1491
 <212> ADN
 <213> Seceuncia artificial

5

<220>
 <223> monoamina oxidasa variante

<400> 35

10

```

atgaccagcc gcgacggtta tcagtggacc ccggaacggt gtctgacca gggcgtaccg 60
tccctgggtg tcatttcgcc gccgactaac atcgaagata ccgataaagg cgggccttgg 120
gatgtcattg tcattggggg cgggtattgt gggctgaccg caaccctgta tttaacctgc 180
gcagggttca agacgtgct gctggaggcc cgtgatcgta ttgggtggccg ctccctggagc 240
15 agtaaatattg acggttaccg gtatgagatg ggtggcactt gggttcattg gcatgaatct 300
cacgtgtggc gtgaaatcac gcgttataaa atgcacaacg cgctgtctcc atcatttaac 360
ttttcacgtg gcgtgaatca cttccaactg cgtaccaatc cgcagaccag tacgtacatg 420
acgcacgaag cggaggatga actgctgcgt agcgcattgc ataaattcac caatgtcgac 480
ggcactaatg gccgtacagt gttgccgttc ccacatgata tgttttatgt gccggaatct 540
20 cgcaagtatg acgaaatgtc atattccgaa cgcattgacc agatccgcga cgaactgtct 600
ttgaacgaac gctctagttt agaggctttc attttattat gtagcgggtg caccctggaa 660
aactccagct ttggtgaatt tctgcattgg tgggcaatgt cgggttacac gtatcagggc 720
tgtatggatt gttaaatctc ctataaattt aaggatggcc agagtgcgtt cgcgcgtcgc 780
ttctgggaag aagccgctgg cactggccgt ctgggttatg tctttggtg tccggtgctg 840
25 tctgtgggtg atgaacgcga cgcagtacgt gttaccgcac gtgacggtcg cgaattcgca 900
gcgaaacggt tggttgcac gattccgctg aacgtattga gttctgttca gtttagccca 960
ccactgtccc cgcaacgcat ggccgctgcg aacattggcc atgtaacca gtgctgcaaa 1020
gtgcatgctg aagtcagtgg tccggatag cgttcattgt cgggtgtgtc ctatccgttc 1080
aacaattag cctacgctat cggcgtatgc acgaccccag cgggtaatac gcatattgtg 1140
30 tgcttcgggg cgcctcataa tcatatccag ccggaagagg acgtggaagc aacgaagatg 1200
gccgttgaaa acatgtcgcc tgggaatatg gatatacaaac gtctggtctt ccacaactgg 1260
tgcaaggatg aatttgccaa aggcgcttgg ttcttcgccc ctccacagct gctgtcaaag 1320
agcctggatg aactgcgctg ccgtcacggt aatgtcctgt ttgcaaacctc cgattggggc 1380
ttaggttggc gtggttttat tgatggtgct atcgaggagg gcacccgcgc agcggttact 1440
35 gtaattgagg aactgcgtcc tgcgcctgcg gtgcggtccc acctgtaatg a 1491
    
```

<210> 36
 <211> 495
 <212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> monoamina oxidasa variante

<400> 36

45

```

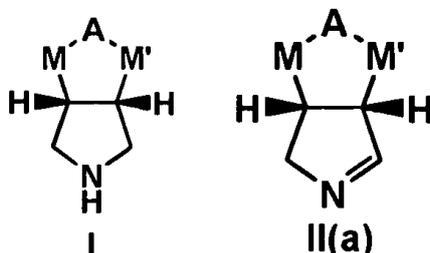
Met Thr Ser Arg Asp Gly Tyr Gln Trp Thr Pro Glu Thr Gly Leu Thr
1          5          10          15
Gln Gly Val Pro Ser Leu Gly Val Ile Ser Pro Pro Thr Asn Ile Glu
50          20          25          30
Asp Thr Asp Lys Asp Gly Pro Trp Asp Val Ile Val Ile Gly Gly Gly
          35          40          45
Tyr Cys Gly Leu Thr Ala Thr Arg Asp Leu Thr Val Ala Gly Phe Lys
          50          55          60
55 Thr Leu Leu Leu Glu Ala Arg Asp Arg Ile Gly Gly Arg Ser Trp Ser
          65          70          75          80
Ser Asn Ile Asp Gly Tyr Pro Tyr Glu Met Gly Gly Thr Trp Val His
          85          90          95
Trp His Glu Ser His Val Trp Arg Glu Ile Thr Arg Tyr Lys Met His
60          100          105          110
Asn Ala Leu Ser Pro Ser Phe Asn Phe Ser Arg Gly Val Asn His Phe
          115          120          125
    
```

ES 2 438 576 T3

	Gln	Leu	Arg	Thr	Asn	Pro	Gln	Thr	Ser	Thr	Tyr	Met	Thr	His	Glu	Ala
		130					135					140				
5	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	His	Lys	Phe	Thr	Asn	Val	Asp
	145					150					155					160
	Gly	Thr	Asn	Gly	Arg	Thr	Val	Leu	Pro	Phe	Pro	His	Asp	Met	Phe	Tyr
				165						170					175	
10	Val	Pro	Glu	Phe	Arg	Lys	Tyr	Asp	Glu	Met	Ser	Tyr	Ser	Glu	Arg	Ile
			180					185						190		
	Asp	Gln	Ile	Arg	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Asn	Glu	Arg	Ser	Ser	Leu	Glu
		195						200					205			
15	Ala	Phe	Ile	Leu	Leu	Cys	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Phe
		210					215					220				
	Gly	Glu	Phe	Leu	His	Trp	Trp	Ala	Met	Ser	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Gly
	225				230						235					240
	Cys	Met	Asp	Cys	Leu	Ile	Ser	Tyr	Lys	Phe	Lys	Asp	Gly	Gln	Ser	Ala
				245						250					255	
20	Phe	Ala	Arg	Arg	Phe	Trp	Glu	Glu	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Arg	Leu	Gly
			260						265					270		
	Tyr	Val	Phe	Gly	Cys	Pro	Val	Arg	Ser	Val	Val	Asp	Glu	Arg	Asp	Ala
		275					280						285			
25	Val	Arg	Val	Thr	Ala	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Phe	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu
		290					295					300				
	Val	Cys	Thr	Ile	Pro	Leu	Asn	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Gln	Phe	Ser	Pro
	305					310					315					320
30	Pro	Leu	Ser	Pro	Gln	Arg	Met	Ala	Ala	Ala	Asn	Ile	Gly	His	Val	Asn
				325						330					335	
	Gln	Cys	Val	Lys	Val	His	Ala	Glu	Val	Ser	Cys	Pro	Asp	Met	Arg	Ser
			340						345					350		
	Trp	Ser	Gly	Val	Ser	Tyr	Pro	Phe	Asn	Lys	Leu	Ala	Tyr	Ala	Ile	Gly
			355					360					365			
35	Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Ala	Gly	Asn	Thr	His	Ile	Val	Cys	Phe	Gly	Gly
	370						375					380				
	Ala	His	Asn	His	Ile	Gln	Pro	Glu	Glu	Asp	Val	Glu	Ala	Thr	Lys	Met
	385					390					395					400
40	Ala	Val	Glu	Asn	Met	Ser	Pro	Gly	Asn	Met	Asp	Ile	Lys	Arg	Leu	Val
				405						410					415	
	Phe	His	Asn	Trp	Cys	Lys	Asp	Glu	Phe	Ala	Lys	Gly	Ala	Trp	Phe	Phe
			420						425					430		
45	Ala	Pro	Pro	Gln	Leu	Leu	Ser	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Cys	Arg
			435					440					445			
	His	Gly	Asn	Val	Leu	Phe	Ala	Asn	Ser	Asp	Trp	Ala	Leu	Gly	Trp	Arg
	450						455					460				
	Gly	Phe	Ile	Asp	Gly	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Thr	Arg	Ala	Ala	Val	Thr
	465					470					475					480
50	Val	Ile	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Ala	Pro	Ala	Val	Arg	Ser	His	Leu	
					485					490					495	

REIVINDICACIONES

1. Una monoaminoxidasa que convierte el compuesto de amina de fórmula estructural I para el compuesto imina de fórmula estructural II(a), en la que contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 88% idéntica a la SEC NRO:10 y en el que el aminoácido correspondiente al residuo 465 de SEC NRO:2 es una glicina, en donde los compuestos I y II(a) tienen las fórmulas estructurales:



en donde A es O, CR₁R₂, -C=C-, o -CH₂-CH₂-, en donde cada R₁ y R₂ son seleccionados independientemente de -H, -COOH, -X, -NH₂, -CH₂NHC(NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₂CH₃, y en donde X es seleccionado de F, Cl, y Br;

M y M' pueden estar ambos presentes y ambos pueden estar ausentes y cuando ambos M y M' están presentes M y M' son lo mismo y son seleccionados de O y CR₃R₄ en donde R₃ y R₄ son H, o R₃ o R₄ de M y R₃ de R₄ de M' forman un puente de metileno; con la estipulación de que

- (a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;
 (b) A puede ser -CH=CH- or -CH₂-CH₂- cuando M y M' son CR₃R₄; y
 (c) cuando M y M' son CR₃R₄ y tienen uno o más sistemas centrales, los sistemas centrales de M y M' son de estereoquímicos opuestos.

2. La monoaminoxidasa según sostiene 1 que convierte el compuesto de amina de la fórmula estructural I a la imina de fórmula estructural II(a) a un promedio de por lo menos 1.5-veces, por lo menos 2-veces, por lo menos 3-veces, por lo menos 4-veces, por lo menos 5-veces, por lo menos 10-veces, por lo menos 25 veces, por lo menos 50-veces, por lo menos 100-veces o más de 100-veces el promedio exhibido de la monoaminoxidasa de SEC NRO:2.

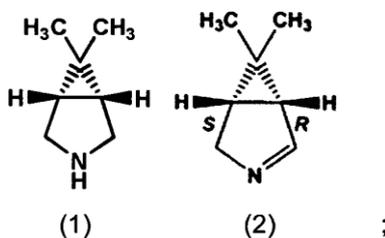
3. La monoaminoxidasa según sostiene 1 que es al menos 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEC NRO: 10.

4. La monoaminoxidasa según sostiene 1 que contiene una secuencia de amino ácido que es al menos el 88% idéntica a la SEC NRO: 10 y es por lo menos 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEC NRO: 12, 14, 16, 18, 20 o 36.

5. La monoaminoxidasa según cualquier sustento precedente, el que contiene una secuencia de amino ácido correspondiente a la SEC NRO: 12, 10, 14, 16, 18, 20 o 36.

6. La monoaminoxidasa según cualquier sustento precedente, en donde la monoaminoxidasa es:

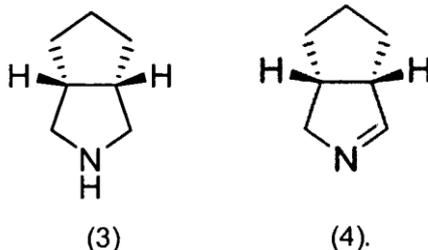
- i) capaz de convertir el sustrato (1R,5S)-6,6-dimetilo-3-azabicyclo [3.1.0]hexano, el compuesto (1) de (1R,5S)-6,6-dimetilo-3- azabicyclo [3.1.0]hex-2-ene, el compuesto (2), con un porcentaje de exceso de estereomérica de por lo menos aproximadamente 95% y a una velocidad que se mejora más de un polipéptido de referencia que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC NRO: 2, en donde los componentes (1) y (2) tienen las fórmulas estructurales:



;

o

- ii) capaz de convertir el sustrato (3aR,6aS) octahidrociclopenta[c]pirrol, el compuesto (3) a (3aS,6aR)1,3a,4,5,6,6a-hexahidrociclopenta[c]pirrol, compuesto (4), con un porcentaje de exceso de diastereoisómero de por lo menos alrededor del 95% y a una velocidad que se mejorada sobre la referencia de un polipéptido teniendo una secuencia del aminoácidos de SEC NRO:2, en donde los compuestos (3) y (4) tienen las fórmulas estructurales:



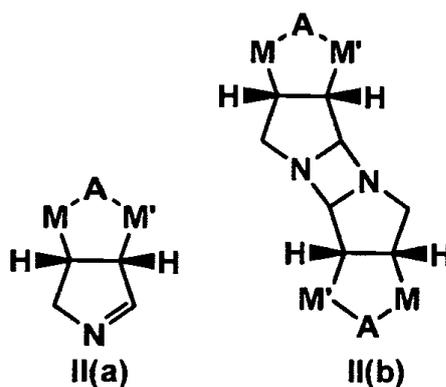
7. La monoamina oxidasa:

(i) según sostiene 6i), el que contiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC NRO: 10 o 12; o

(ii) según sostiene 6ii) el que contiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC NRO: 10, 14, 16, 18, 20 o 36.

8. Un polinucleótido que codifica la monoamina oxidasa de acuerdo con cualquiera de los las reivindicaciones precedentes, en el que el polinucleótido comprende opcionalmente la SEQ ID NO: 11,9, 13, 15, 17, 19, o 35.

9. Un método de preparación de un compuesto sustancialmente estereoméricamente puro según la fórmula estructural II:



incluye sales e hidratos de esto, en donde:

A es O, CR^1R^2 , $-C=C-$, o $-CH_2-CH_2-$, en donde cada R^1 y R^2 son independientemente seleccionados de $-H$, $-COOH$, $-X$, $-NH_2$, $-CH_2NHC(NH)NH_2$, $-CX_3$, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, y en donde X es seleccionado de F, Cl, y Br;

M y M' pueden ambos estar presentes o pueden ambos estar ausentes y cuando ambas M y M' están presentes M y M' son lo mismo y son **seleccionadas** de O y CR^3R^4 en donde R^3 y R^4 son H, o R^3 o R^4 de M y R^3 o R^4 de M' forman un puente de metileno;

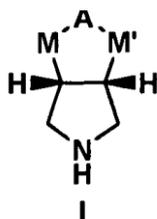
con las condiciones de que

(a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;

(b) A puede ser $-CH=CH-$ or $-CH_2-CH_2-$ cuando M y M' son CR^3R^4 ; y

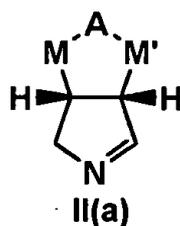
(c) cuando M y M' son CR^3R^4 y tienen uno o más sistemas centrales, los sistemas centrales de M y M' son de estereoquímica opuestas;

el método contiene una amina de contacto según la formula estructural I



en donde A, M y M' están como definidos para una fórmula estructural II(a) y (IIb), con oxígeno y una enzima de **monoaminoxidasa** según cualquiera de los sustentos 1-7 en la presencia de un co-factor bajo condiciones en los que la enzima de la **monoaminoxidasa** oxida el compuesto de amina de fórmula estructural I a un compuesto correspondiente imina de fórmula estructural II (a), el dímero del mismo de fórmula II (b), o una mezcla de los mismos.

10. Un método según sostiene 9, que es un método de preparar un compuesto sustancialmente estereoméricamente puro según la fórmula estructural II (a):



incluye sales e hidratos de esto, en donde

A es O, CR¹R², -C=C-, o -CH₂-CH₂-, en donde cada R¹ y R² son seleccionados independientemente de -H, -COOH, -X, -NH₂, -CH₂NHC (NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₂CH₃, y en donde X es seleccionado de F, Cl, y Br;

M y M' ambos puede estar presentes o ambos pueden estar ausentes cuando ambas M y M' están presentes M y M' son lo mismo y son selecciones de O y CR³R⁴ en donde R³ y R⁴ son H, o R³ o R⁴ de M y R³ o R⁴ de M' forman un puente de metileno;

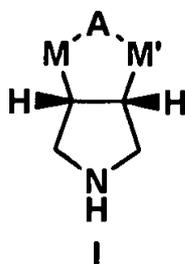
con las condiciones de que

(a) cuando M y M' con O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;

(b) A puede ser -CH=CH- o -CH₂-CH₂- cuando M y M' son CR³R⁴; y

(c) cuando M y M' son CR³R⁴ y tienen uno o más estereocentros de M y M' , son de estereoquímica opuesta;

el método comprende tratar un compuesto de amina según la fórmula estructural I



en donde A, M y M' están como definidas por la fórmula estructural 11(a), con oxígeno y una enzima monoaminoxidasa según cualquiera de los sostenidos 1-7 en la presencia de un co-factor bajo condiciones en los que la enzima monoaminoxidasa oxida la amina de la fórmula estructural I en una imina correspondiente a la fórmula estructural II(a).

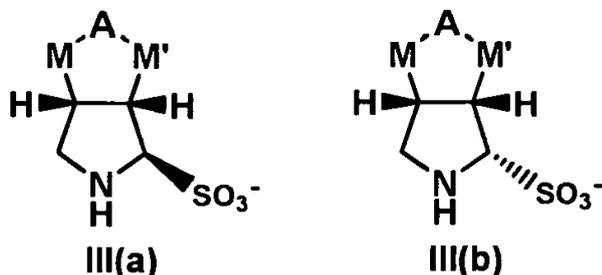
11. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que el co-factor es:

- i) asociado no covalentemente con la enzima monoamina oxidasa; o
- ii) seleccionado del grupo que consiste de FAD, FMN, NAD, y NADP.

12. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, que comprende además un componente de un

catalizador de desproporción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al oxígeno molecular y agua, en la que el componente se selecciona opcionalmente del grupo que consiste de Pd, Fe, y una enzima de catalasa

13. Un método de preparación de una mezcla que comprende un compuesto aminosulfonate sustancialmente enantioméricamente puro según la fórmula estructural III (a) y un compuesto aminosulfonate sustancialmente enantioméricamente puro según la fórmula estructural III (b):



incluye sales e hidratos de estos, en donde:

A es O, CR¹R², -C=C-, o -CH₂-CH₂-, en donde cada R¹ y R² son independientemente seleccionados de -H, -COOH, -X, -NH₂, -CH₂NHC(NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₂CH₃, e donde X es seleccionado de F, Cl, y Br;

M y M' ambos pueden estar presente y pueden ambos estar ausentes y cuando ambas M y M' están presentes M y M' son lo mismo y son seleccionados de O y CR³R⁴ en donde R³ y R⁴ son H, o R³ o R⁴ de M y R³ o R⁴ de M' forman un puente de metileno; con la condición de que

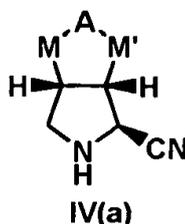
(a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;

(b) A puede ser -CH=CH- or -CH₂-CH₂- cuando M y M' son CR³R⁴;

(c) cuando M y M' son CR³R⁴ and tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta;

que comprende además la adición de bisulfito en condiciones que producen la mezcla que comprende un compuesto aminosulfonate sustancialmente enantioméricamente puro según la fórmula estructural III (a) y un compuesto aminosulfonate sustancialmente enantioméricamente puro según la fórmula estructural III (b), en el que el bisulfito se añade opcionalmente a la reacción antes de o simultáneamente con la oxidasa monoamina, o después de la adición de la monoamina oxidasa.

14. Un método de preparación de un compuesto aminonitrilo sustancialmente enantioméricamente puro según la fórmula estructural IV (a):



incluye sales e hidratos de estos, en donde:

A es O, CR¹R², -C=C-, o -CH₂-CH₂-, en donde cada R¹ y R² son seleccionadas independientes de -H, -COOH, -X, -NH₂, -CH₂NHC(NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₂CH₃, y en donde X es seleccionada de F, Cl, y Br; M y M' pueden ambos estar presentes o pueden ambos estar ausentes y cuando ambos M y M' están presentes M y M' son lo mismo y son seleccionados de O y CR³R⁴ en donde R³ y R⁴ son H, o R³ o R⁴ de M y R³ o R⁴ de M' forman un puente de metileno;

con la condición de que

(a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;

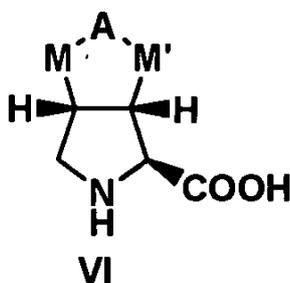
(b) A puede ser -CH=CH- or -CH₂-CH₂- cuando M y M' son CR³R⁴; y

(c) cuando M y M' son CR³R⁴ y no tienen uno o más estereocentros, de los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuestas;

el método contiene:

- i. el método de la reivindicación 13 y que comprende además tratar los compuestos de acuerdo con fórmulas estructurales III (a) y III (b) con cianuro bajo condiciones que producen el compuesto aminonitrilo sustancialmente enantioméricamente puro según la fórmula estructural IV (a), o
- ii. el método de la reivindicación 9 y que comprende además tratar los compuestos de acuerdo con las fórmulas estructurales II (a) o II (b) o la mezcla de los mismos con cianuro bajo condiciones que producen el compuesto aminonitrilo sustancialmente enantioméricamente puro según la fórmula estructural IV (a).

15. Un método de preparación de un compuesto de aminoácidos sustancialmente estereoméricamente puros según la fórmula estructural VI:



incluye sales de estos, en donde:

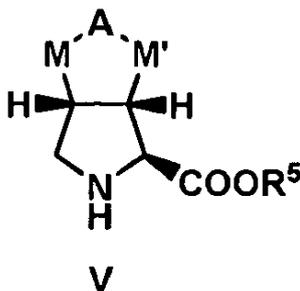
A es O, CR¹R², -C=C-, o -CH₂-CH₂-, en donde cada R¹ y R² son seleccionados independientemente de -H, -COOH, -X, -NH₂, -CH₂NHC(NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₂CH₃, y en donde X es seleccionado de F, Cl, y Br;

M y M' pueden ambos estar presentes o pueden ambos estar ausentes y cuando ambos M y M' están presentes M y M' son lo mismo y son seleccionados de O y CR₃R₄ en donde R₃ y R₄ son H, o R₃ o R₄ de M y R₃ o R₄ de M' forman un puente de metileno; con la condición de que

- (a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;
- (b) A puede ser -CH=CH- o -CH₂-CH₂- cuando M y M' son CR₃R₄; y
- (c) cuando M y M' son CR₃R₄ y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son de estereoquímica opuesta;

el método que comprende el método de la reivindicación 14 y que comprende además tratar el compuesto aminonitrilo de fórmula estructural IV (a) con un ácido y agua en condiciones en las que el compuesto aminonitrilo se convierte en el compuesto de aminoácidos sustancialmente estereoméricamente puros según la fórmula estructural VI.

16. Un método de preparación de un compuesto sustancialmente enantioméricamente puro según la fórmula estructural V:



incluye sales de estos, en donde:

R⁵ es (C₁-C₆) alquilo;

A es O, CR¹R², -C=C-, o -CH₂-CH₂-, en donde cada R¹ y R² son seleccionados independientemente de -H, -COOH, -X, -NH₂, -CH₂NHC(NH)NH₂, -CX₃, -CH₃, -CH₂CH₃, y en donde X es seleccionado de F, Cl,

y Br;

M y M' pueden ambos estar presentes o pueden ambos estar ausentes y cuando ambas M y M' están presentes M y M' son lo mismo y son seleccionados de O y CR³R⁴ en donde R³ y R⁴ son H, o R³ o R⁴ de M y R³ o R⁴ de M' forman un puente de meliteno;

con las condiciones de que

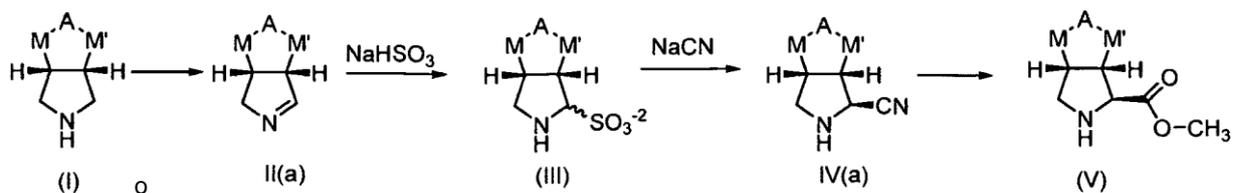
(a) cuando M y M' son O, A no es O; y cuando A es O, M y M' no son O;

(b) A puede ser -CH=CH- o -CH₂-CH₂- cuando M y M' son CR³R⁴; y

(c) cuando M y M' son CR³R⁴ y tienen uno o más estereocentros, los estereocentros de M y M' son estereoquímicos opuestos;

el método contiene:

- i. el método de la reivindicación 14 y que comprende además tratar el compuesto aminonitrilo de fórmula estructural IV (a) con un ácido y un alcohol bajo condiciones en las que el compuesto aminonitrilo se convierte en el compuesto de éster de aminoácido sustancialmente estereoméricamente puro según la fórmula estructural V, y en el que el método comprende opcionalmente las etapas de:



- ii. el método de la reivindicación 15 y que comprende además tratar un compuesto de aminoácidos sustancialmente estereoméricamente puros de acuerdo con la fórmula estructural VI con un ácido y un compuesto seleccionado del grupo que consiste de R⁵-OH y R⁵O⁻ (O) CH₃ bajo condiciones en las que el amino compuesto de ácido según la fórmula estructural VI se convierte en el compuesto aminoéster sustancialmente enantioméricamente puro según la fórmula estructural V, y en el que el método comprende opcionalmente las etapas de:

