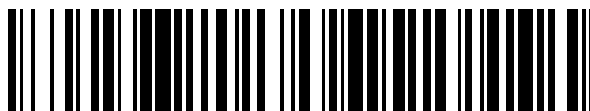


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 560**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

A61K 31/137 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2010 E 10810597 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2467473**

54 Título: **Polipéptidos cetorreductasa para preparar fenilefrina**

30 Prioridad:

19.08.2009 US 235324 P

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

29.06.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ALVIZO, OSCAR;
COLLIER, STEVEN, J.;
HENNEMANN, JOERG;
OH, SEONG, HO y
ZHA, WENJUAN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 575 560 T3

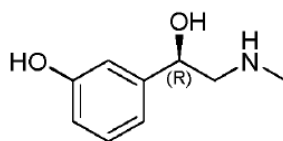
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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).

Polipéptidos cetorreductasa para preparar fenilefrina**Descripción****5 CAMPO TÉCNICO**

La divulgación se refiere a polipéptidos cetorreductasa manipulados y a procesos para utilizar los polipéptidos para la producción de fenilefrina.

10 ANTECEDENTES

La (R)-fenilefrina (representada en el presente documento como compuesto (1)) es un agonista del receptor α 1-adrenérgico utilizado como descongestionante, dilatador de las pupilas y para aumentar la presión arterial.

**(1)**

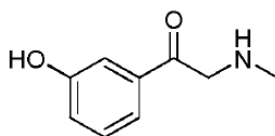
La fenilefrina se utiliza como sustituto de la pseudoefedrina (por ejemplo, Sudafed® de Pfizer). La fenilefrina es un agonista del receptor α -adrenérgico selectivo y no genera liberación de noradrenalina endógena. Es menos probable que la fenilefrina cause efectos secundarios tales como la estimulación del sistema nervioso central, insomnio, ansiedad, irritabilidad e inquietud.

Se han descrito diversos métodos de reacción química para la síntesis de fenilefrina. En el documento US 6.900.203 se describe una ruta de síntesis hacia la fenilefrina, que incluye una adición quiral de cianuro a un producto intermedio fenaldehído con anillo fluorado utilizando una enzima hidroxinitrilo liasa. No se han descrito rutas hacia la fenilefrina que impliquen una reducción estereoselectiva utilizando una cetorreductasa.

En el documento WO2009/036404 se describe una cetorreductasa basada en una de tipo silvestre de *L. kefir* que tiene una citosina en la posición 206.

RESUMEN

La divulgación proporciona métodos y polipéptidos para la reducción estereoselectiva de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona (representada en el presente documento como compuesto (2)) a fenilefrina utilizando un polipéptido cetorreductasa manipulado (denominado como alternativa KRED).

**(2)**

La divulgación proporciona polipéptidos manipulados con actividad cetorreductasa, polinucleótidos que codifican los polipéptidos, y métodos de uso de los polipéptidos para la síntesis de compuestos enantioespecíficos.

La invención proporciona un polipéptido manipulado capaz de convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (R)-fenilefrina, en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido tiene una identidad de al menos 70% con la SEQ ID NO: 4 y comprende la diferencia de residuo M206C.

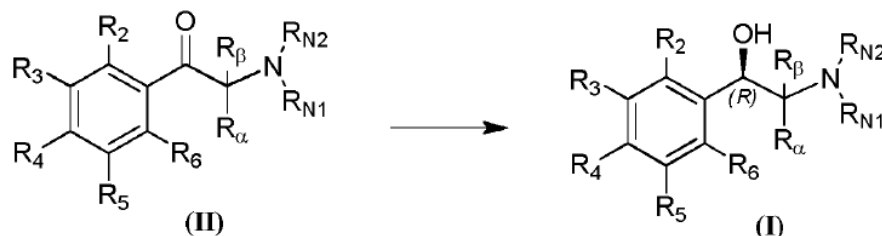
La invención también proporciona un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de la invención.

La invención también proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la invención unido operativamente a una secuencia de control adecuada para dirigir la expresión en una célula hospedadora.

La invención también proporciona una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la invención.

La invención también proporciona un método para preparar un polipéptido manipulado de la invención que comprende cultivar una célula hospedadora de la invención.

La invención también proporciona un método para producir un compuesto de Fórmula I a partir de un compuesto de Fórmula II:



en las que R_2 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -NH₂, -NHCH₃, o un alquilo de cadena larga;

en las que R_3 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -S(O)CH₃, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -OR, -SR, -NR₂, -SO₂NR₂ (en los que R = -H, -CH₃, o alquilo), etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, o un alquilo de cadena larga;

en las que R_4 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -S(O)CH₃, -SO₂CH₃, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, SO₂NR₂ (en el que R = -H, -CH₃);

en las que R_5 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -S(O)CH₃, -SO₂CH₃, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -OR, -SR, -NR₂, -SO₂NR₂ (en los que R = -H, -CH₃, o alquilo), etilo, propilo, isopropilo o ciclopropilo;

en las que R_6 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -SH, o -NH₂;

en las que R_2 y R_3 , R_3 y R_4 , o R_4 y R_5 pueden estar opcionalmente conectados como parte de un anillo de 5 ó 6 miembros;

en las que R_α es un grupo seleccionado de entre: -H, -CH₃, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, o un alquilo de cadena larga;

en las que R_β es un grupo seleccionado de entre: -H, -CH₃, etilo, propilo, isopropilo o ciclopropilo;

en las que R_α y R_β pueden formar un anillo, o en las que la unidad R_α - R_β es un grupo funcional carbonilo o imino;

en las que R_{N1} y R_{N2} pueden ser independientemente un grupo seleccionado de entre: -H, -CH₃, -OH, -OCH₃, -OR, -C(O)R (en los que R = -H, -CH₃, o alquilo), etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, alquilo de cadena larga, carbonilo, o carboxi;

comprendiendo el método poner en contacto una mezcla que comprende el compuesto de Fórmula II con un polipéptido de la invención, en condiciones de reacción adecuadas para convertir el compuesto de Fórmula II en el compuesto de Fórmula I.

Los polipéptidos cetorreductasa manipulados de la divulgación son capaces de catalizar la conversión del compuesto (2) en el compuesto (1) con una actividad relativa al menos 10 veces mayor que el polipéptido cetorreductasa de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2, y con una estereoselectividad mejorada capaz de proporcionar el compuesto (1) en > 99% de e.e. Por consiguiente, en algunas formas de realización, la divulgación proporciona métodos de uso de los polipéptidos manipulados para sintetizar la (R)-fenilefrina del compuesto (1). Los métodos incluyen intervalos de pH, concentraciones de alcohol isopropílico (IPA) y sustancias tampón que son útiles para mantener la estabilidad del sustrato y proporcionar una catálisis mejorada (por ejemplo, mayor conversión con mayor carga de sustrato a menores concentraciones de enzima).

En una forma de realización, los polipéptidos manipulados tienen propiedades enzimáticas mejoradas en comparación con la cetorreductasa natural de *L. kefir*, cuya secuencia está representada por la SEQ ID NO: 2, en particular, los polipéptidos manipulados son capaces de convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (R)-fenilefrina con una actividad y enantioselectividad mejoradas. En algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados con actividad cetorreductasa están mejorados en cuanto a la actividad y enantioselectividad para convertir el compuesto (2) en el compuesto (1) en comparación con otro polipéptido cetorreductasa manipulado, tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34. Las propiedades mejoradas de los polipéptidos manipulados proporcionan procesos mejorados para preparar el compuesto (1) y compuestos relacionados de Fórmula I (véase más adelante). Además de la actividad enzimática mejorada (por ejemplo, la tasa de conversión), los polipéptidos manipulados de la divulgación comprenden una estabilidad frente al pH mejorada, características en el disolvente mejoradas (por ejemplo, la actividad en alcohol isopropílico al 50%), y una descomposición no enzimática del sustrato reducida (es decir, compuesto (2)). En algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados con actividad cetorreductasa se caracterizan por una combinación de propiedades mejoradas, tales como el aumento de la actividad enzimática, la estabilidad frente al pH, y una

descomposición del compuesto (2) reducida en comparación con una cetorreductasa de tipo silvestre (por ejemplo, una cetorreductasa de *L. kefir*).

En algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados con actividad cetorreductasa están mejorados con respecto a la actividad enzimática en comparación con la actividad del polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 4 en la síntesis del compuesto (1). En algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados con actividad cetorreductasa tienen al menos 7 veces más actividad que la SEQ ID NO: 4 en una condición de reacción de pH de aproximadamente 6,0-7,5 y una temperatura de aproximadamente 25°C-35°C. En algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados son capaces de convertir el compuesto (2) en el compuesto (1) con una actividad al menos 14 veces, al menos 28 veces, al menos 46 veces, al menos 74 veces, al menos 112 veces, al menos 134 veces, al menos 160 veces mayor que la actividad del polipéptido de la SEQ ID NO: 4.

En algunas formas de realización, la mejora de la actividad enzimática de los polipéptidos manipulados con actividad cetorreductasa puede caracterizarse por un aumento de la generación de un alcohol quiral (por ejemplo, un compuesto de Fórmula I) a partir de una cetona (por ejemplo, un compuesto de Fórmula II), tal como la conversión enantioespecífica de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona (compuesto (2)) en (*R*)-fenilefrina (compuesto (1)) en una condición definida. En algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados son capaces de esta conversión con un rendimiento del compuesto (1) de al menos un 80%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, o más, hasta el rendimiento teórico del 100% en la condición definida. En algunas formas de realización, la condición definida para la conversión enzimática utilizando un polipéptido manipulado de la divulgación comprende un pH de aproximadamente 6,0-7,5 (por ejemplo, aproximadamente 7,0). En algunas formas de realización, la condición definida comprende un pH ajustado después de dos horas de reacción de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 6,75. En algunas formas de realización, la condición definida comprende una temperatura de aproximadamente 25°C-40°C (por ejemplo, aproximadamente 30°C). En algunas formas de realización, la condición definida comprende un disolvente que comprende una solución tampón (por ejemplo, TEA 0,1 M o fosfato potásico 0,05 M) y alcohol isopropílico al 50% (v/v). En algunas formas de realización, la condición definida comprende una carga de sustrato (por ejemplo, una concentración del compuesto (2)) de al menos aproximadamente 50 g/l-400 g/l (por ejemplo, aproximadamente 50 g/l-100 g/l, aproximadamente 50 g/l-200 g/l, aproximadamente 50 g/l-300 g/l, aproximadamente 50 g/l-400 g/l, aproximadamente 100 g/l, aproximadamente 200 g/l, aproximadamente 300 g/l o aproximadamente 400 g/l). En algunas formas de realización, la condición definida comprende una carga de polipéptido manipulado de aproximadamente 0,1 g/l-1,5 g/l, aproximadamente 0,5 g/l-1,2 g/l, o aproximadamente 0,7 g/l-1,0 g/l. En algunas formas de realización, la condición definida comprende aproximadamente 0,03 g/l-0,1 g/l de NADP. En algunas formas de realización, la condición definida comprende llevar a cabo la reacción en atmósfera inerte (por ejemplo, N₂).

En algunas formas de realización, la condición definida comprende una combinación de las anteriores, por ejemplo: (1) una carga de sustrato de al menos aproximadamente 50 g/l-300 g/l de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona; (2) una carga de polipéptido manipulado de aproximadamente 0,1 g/l-1,5 g/l; (3) un pH de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente 7,5; (3) IPA a aproximadamente el 50% (v/v); (4) aproximadamente 0,03-0,1 g/l de NADP; y (5) una temperatura de reacción de aproximadamente 25°C-35°C.

En algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados en las condiciones definidas anteriormente son capaces de convertir al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 97%, al menos un 99%, o más, de compuesto (2) en compuesto (1) en un tiempo de reacción de aproximadamente 8-24 horas. En algunas formas de realización, la tasa de conversión comprende al menos un 70%, 80%, 90% ó 99% en un tiempo de reacción de 24 horas o menos.

En algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados con actividad cetorreductasa están mejorados con respecto al nivel de descomposición del sustrato no enzimática no deseada durante la síntesis de (*R*)-fenilefrina. En algunas formas de realización, el nivel de productos de descomposición del compuesto (2) es inferior al 10%, inferior al 7,5%, inferior al 6%, inferior al 5%, inferior al 4%, inferior al 3%, inferior al 2%, inferior al 1%, inferior al 0,5%, inferior al 0,2%, o inferior al 0,1% de la fenilefrina total formada.

En algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados son capaces de convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (*R*)-fenilefrina y comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, con una secuencia de referencia de la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34 y que comprende al menos una diferencia de residuo en una posición correspondiente a T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, E145, A145, F147, L147, V148, T152, L153, S159, Y190, C190, D197, E200, A202, M206 o Y249.

En algunas formas de realización, el polipéptido manipulado es capaz de convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (*R*)-fenilefrina y tiene una identidad de al menos un 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, o más, con la secuencia de referencia de la SEQ ID NO: 4 y comprende al menos una diferencia de residuo en una posición de la SEQ ID NO: 4 correspondiente a T2, I11, A64, T76, V95, V99, V148, T152, L153, S159 o D197. En determinadas formas de realización, el polipéptido manipulado comprende adicionalmente al menos una diferencia de residuo en

una posición de la SEQ ID NO: 4 correspondiente a S96, L147, T152, L153, C190, E200 o Y249. En determinadas formas de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido manipulado comprende al menos una diferencia de residuo en comparación con la SEQ ID NO: 4 seleccionada de entre T2S, I11L, A64V, T76I, V95M, S96L, L147I, C190G, A202F, M206C e Y249F, y en una forma de realización comprende la diferencia de residuo V95M. En determinadas formas de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido manipulado comprende al menos dos diferencias de residuo en comparación con la SEQ ID NO: 4 seleccionadas de entre V95M, S96L, L147I, C190G, A202F, M206C e Y249F, y en una forma de realización la secuencia de aminoácidos comprende las diferencias de residuo en comparación con la SEQ ID NO: 4 de: V95M, A202F y M206C. En determinadas formas de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido manipulado comprende las diferencias de residuo en comparación con la SEQ ID NO: 4 de: V95M, C190G, A202F y M206C.

En determinadas formas de realización, el polipéptido manipulado es capaz de convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (*R*)-fenilefrina y tiene una identidad de al menos un 70% con la secuencia de referencia de la SEQ ID NO: 4, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una diferencia de residuo en una posición de la SEQ ID NO: 4 correspondiente a T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, A145, L147, V148, T152, L153, S159, C190, D197, E200, A202, M206 o Y249, y comprende adicionalmente al menos 1-60 sustituciones conservadoras de aminoácidos en posiciones de la SEQ ID NO: 4 distintas de las correspondientes a I11, A64, T76, V95, S96, V99, A145, L147, V148, T152, L153, S159, C190, D197, E200, A202, M206 e Y249.

En determinadas formas de realización, el polipéptido manipulado es capaz de convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (*R*)-fenilefrina y tiene una identidad de al menos un 70% con la secuencia de referencia de la SEQ ID NO: 4, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una diferencia de residuo en una posición de la SEQ ID NO: 4 correspondiente a T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, A145, L147, V148, T152, L153, S159, C190, D197, E200, A202, M206 o Y249, y comprende adicionalmente al menos una diferencia de residuo seleccionada de uno de los seis grupos siguientes: (1) I11, A64, T76, S96, L147 y/o V148 está sustituido con un aminoácido seleccionado de entre alanina (A), leucina (L), isoleucina (I) y valina (V); (2) V95, V99, T152, L153, C190 y/o D197 está sustituido con un aminoácido seleccionado de entre alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), glicina (G) o metionina (M); (3) A202 y/o Y249 está sustituido con un aminoácido seleccionado de entre tirosina (Y), fenilalanina (F) o triptófano (W); (4) S159 está sustituido con un aminoácido seleccionado de entre asparagina (N), glutamina (Q), serina (S) o treonina (T); (5) E200 está sustituido con un aminoácido seleccionado de entre prolina (P) o histidina (H); (6) M206 está sustituido con una cisteína.

En algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados de la presente divulgación pueden comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una o más diferencias de residuo en una posición de la SEQ ID NO: 4 correspondiente a T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, A145, L147, V148, T152, L153, S159, C190, D197, E200, A202, M206 e Y249, y puede incluir adicionalmente una o más diferencias de residuo en otras posiciones de residuo (es decir, posiciones distintas de T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, A145, L147, V148, T152, L153, S159, C190, D197, E200, A202, M206 e Y249). Por consiguiente, en determinadas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa manipulados pueden tener, además, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-14, 1-15, 1-16, 1-18, 1-20, 1-22, 1-24, 1-26, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 1-55 ó 1-60 diferencias de residuo en otras posiciones de residuo de aminoácido. En algunas formas de realización, el número de diferencias puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55 ó 60 diferencias de residuo en las demás posiciones de residuo de aminoácido (es decir, además de los residuos 11, 64, 76, 95, 96, 99, 145, 147, 148, 152, 153, 159, 190, 197, 200, 202, 206 y 249). En algunas formas de realización, las diferencias de residuo en las posiciones de la SEQ ID NO: 4 distintas de T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, A145, L147, V148, T152, L153, S159, C190, D197, E200, A202, M206 e Y249 comprenden sustituciones conservadoras.

En algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados capaces de convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (*R*)-fenilefrina comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, a la SEQ ID NO: 2, y comprenden adicionalmente la combinación de diferencias de residuo de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34, en comparación con la SEQ ID NO: 2. En determinadas formas de realización, los polipéptidos manipulados comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 70% a la SEQ ID NO: 4, y comprenden adicionalmente la combinación de diferencias de residuo de cualquiera de las SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34, en comparación con la SEQ ID NO: 2.

En algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados con actividad cetorreductasa que catalizan un exceso enantiomérico de al menos un 99% de (*R*)-fenilefrina comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34.

En otra forma de realización, la presente divulgación proporciona métodos para preparar un compuesto producto (*R*)-fenilefrina que comprende: poner en contacto un polipéptido manipulado de la presente divulgación (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente y en otras partes del presente documento) con una mezcla que comprende un

sustrato 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona y un tampón, en condiciones de reacción adecuadas para convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (*R*)-fenilefrina.

Por consiguiente, en algunas formas de realización, pueden llevarse a cabo los métodos para preparar un compuesto producto (*R*)-fenilefrina en los que el polipéptido manipulado está seleccionado de entre los polipéptidos de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34; o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, a la SEQ ID NO: 2, que comprende adicionalmente la combinación de diferencias de residuo de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34, en comparación con la SEQ ID NO: 2.

En determinadas formas de realización, pueden llevarse a cabo los métodos para preparar un compuesto producto (*R*)-fenilefrina en los que el sustrato 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona está seleccionado de entre el compuesto (2) o el compuesto (2a) (es decir, la forma hidrosulfato del compuesto (2) que se muestra más adelante).

En determinadas formas de realización, pueden llevarse a cabo los métodos para preparar (*R*)-fenilefrina de la presente divulgación en los que las condiciones de reacción comprenden un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5 (por ejemplo, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0, o aproximadamente 7,0). En algunas formas de realización, puede llevarse a cabo el método en el que las condiciones de reacción comprenden un pH inicial de aproximadamente 7,0 y, a continuación, ajustar el pH inicial a aproximadamente 6,75 después de aproximadamente 2 horas. En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente, una vez finalizada la reacción enzimática, las etapas de saturar la mezcla con sal (por ejemplo, NaCl) y ajustar el pH de 8,0 a 9,0, produciendo así una base libre del compuesto (1). En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente, una vez finalizada la reacción enzimática, la etapa de extraer la base libre del compuesto (1) con alcohol isopropílico (IPA). En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente, una vez finalizada la reacción enzimática, la etapa de acidificar (por ejemplo, con HCl) el extracto IPA de la mezcla y aislar la sal de (*R*)-fenilefrina (por ejemplo, sal de HCl del compuesto (1a) que se presenta más adelante).

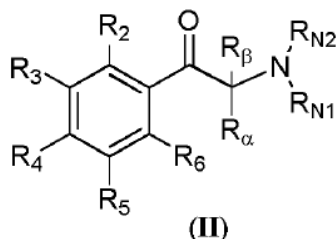
En algunas formas de realización, pueden llevarse a cabo los métodos para preparar (*R*)-fenilefrina de la presente divulgación en los que la mezcla comprende al menos aproximadamente 50 g/l-400 g/l de carga de sustrato 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona (por ejemplo, aproximadamente 50 g/l-100 g/l, aproximadamente 50 g/l-200 g/l, aproximadamente 50 g/l-300 g/l, aproximadamente 50 g/l-400 g/l, aproximadamente 100 g/l, aproximadamente 200 g/l, aproximadamente 300 g/l o aproximadamente 400 g/l). Los valores de las cargas de sustrato proporcionados en el presente documento se basan en el peso molecular de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona (es decir, el compuesto (2)) y contempla que también puedan utilizarse cantidades molares equivalentes de hidrosulfato de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona (compuesto (2a)) (por ejemplo, 100 g/l de compuesto (2) equivalen a aproximadamente 130 g/l de compuesto (2a)).

En algunas formas de realización, pueden llevarse a cabo los métodos para preparar (*R*)-fenilefrina de la presente divulgación en los que la concentración de polipéptido manipulado resultante en la mezcla es aproximadamente 0,1 g/l-1,5 g/l, aproximadamente 0,5 g/l-1,2 g/l, o aproximadamente 0,7 g/l-1,0 g/l. En determinadas formas de realización, puede llevarse a cabo el método en el que las condiciones de reacción comprenden una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 35°C (por ejemplo, a aproximadamente 30°C). En determinadas formas de realización, puede llevarse a cabo el método en el que la mezcla comprende un disolvente que comprende un tampón y alcohol isopropílico al 50% (v/v). En algunas formas de realización, el tampón está seleccionado de entre trietanolamina (por ejemplo, TEA aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 0,25 M, o TEA aproximadamente 0,1 M) y fosfato potásico (por ejemplo, fosfato aproximadamente 0,025 M a aproximadamente 0,1 M, o fosfato aproximadamente 0,05 M). En determinadas formas de realización, puede llevarse a cabo el método en el que la mezcla comprende aproximadamente 0,03 g/l-0,1 g/l de NADP (por ejemplo, aproximadamente 0,05 g/l de NADP). En determinadas formas de realización, puede llevarse a cabo el método en el que las condiciones de reacción comprenden una atmósfera inerte (por ejemplo, N₂, Ar, etc.).

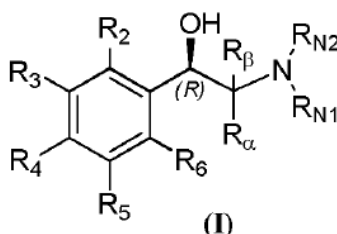
Por consiguiente, en algunas formas de realización, los métodos para preparar (*R*)-fenilefrina de la presente divulgación pueden llevarse a cabo utilizando una combinación de cualquiera de las condiciones de mezcla y de reacción descritas anteriormente (y en otras partes del presente documento), por ejemplo, (1) un pH de aproximadamente 6,75-7,0; (2) una temperatura de aproximadamente 30°C; (3) alcohol isopropílico a aproximadamente el 50%; (4) aproximadamente 0,05 g/l de NADP; (5) aproximadamente 100 g/l de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona; (5) y aproximadamente 0,7 g/l-1,1 g/l del polipéptido; y (6) atmósfera de N₂.

En algunas formas de realización, el método puede comprender las condiciones de reacción de un pH de aproximadamente 6,75-7,0, una temperatura de aproximadamente 30°C, aproximadamente 100 g/l de compuesto (2) (ó 130 g/l del hidrosulfato del compuesto (2a)), y aproximadamente 1 g/l de un polipéptido que tiene una secuencia como la presentada en la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34 en un tiempo de reacción de aproximadamente 19-24 horas, en el que al menos el 50%-99% del sustrato se convierte en (*R*)-fenilefrina.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para la conversión estereoselectiva de un compuesto sustrato de Fórmula II:



en un compuesto producto de Fórmula I:



en las que R₂ es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -NH₂, -NHCH₃, o un alquilo de cadena larga; R₃ es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -S(O)CH₃, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -OR, -SR, -NR₂, -SO₂NR₂ (en los que R = -H, -CH₃, o alquilo), etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, o un alquilo de cadena larga; R₄ es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -S(O)CH₃, -SO₂CH₃, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, SO₂NR₂ (en el que R = -H, -CH₃); R₅ es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -S(O)CH₃, -SO₂CH₃, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -OR, -SR, -NR₂, -SO₂NR₂ (en los que R = -H, -CH₃, o alquilo), etilo, propilo, isopropilo o ciclopropilo; R₆ es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -SH, o -NH₂; en las que R₂ y R₃, R₃ y R₄, o R₄ y R₅ pueden estar opcionalmente conectados como parte de un anillo de 5 ó 6 miembros; en las que R_α es un grupo seleccionado de entre: -H, -CH₃, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, o un alquilo de cadena larga; en las que R_β es un grupo seleccionado de entre: -H, -CH₃, etilo, propilo, isopropilo o ciclopropilo; en las que R_α y R_β pueden formar un anillo, o en las que la unidad R_α-R_β es un grupo funcional carbonilo o imino; en las que R_{N1} y R_{N2} pueden ser independientemente un grupo seleccionado de entre: -H, -CH₃, -OH, -OCH₃, -OR, -C(O)R (en los que R = -H, -CH₃, o alquilo), etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, alquilo de cadena larga, carbonilo, o carboxi.

En algunas formas de realización del método, el compuesto sustrato de Fórmula II es 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona, compuesto (2), y el producto de Fórmula I es el compuesto (1), (R)-fenilefrina.

En otro aspecto, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican los polipéptidos manipulados descritos en el presente documento o polinucleótidos que hibridan con tales polinucleótidos en condiciones muy rigurosas. El polinucleótido puede incluir promotores y otros elementos reguladores útiles para la expresión del polipéptido codificado con actividad cetorreductasa, y puede utilizar codones optimizados para los sistemas de expresión deseados específicos. Los polinucleótidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, la SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 y 33.

En otra forma de realización, la divulgación proporciona células hospedadoras que comprenden los polinucleótidos y/o vectores de expresión descritos en el presente documento. Las células hospedadoras pueden ser procariotas o eucariotas. En una forma de realización, la célula hospedadora puede ser *E. coli*, o un organismo procariota diferente. En otra forma de realización, la célula hospedadora puede ser una célula de levadura. Las células hospedadoras pueden utilizarse para la expresión y el aislamiento de los polipéptidos manipulados descritos en el presente documento, o, como alternativa, pueden utilizarse directamente para la conversión del sustrato en, por ejemplo, un producto fenilefrina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Tal como se utilizan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/a" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por

ejemplo, la referencia a "un sustrato" incluye una pluralidad de tales sustratos y la referencia a "la enzima" incluye la referencia a una o más enzimas, y así sucesivamente.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Aunque puede utilizarse cualquier método y reactivo similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica de los métodos y composiciones descritos, a continuación se describen los métodos y materiales ejemplares.

Además, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa. Del mismo modo, "comprender", "comprende", "que comprende" "incluir", "incluye" y "que incluye" son intercambiables y no pretenden ser limitativos.

Debe entenderse además que, cuando las descripciones de diversas formas de realización utilizan la expresión "que comprende", los expertos en la materia entenderán que, en algunos casos específicos, una forma de realización puede describirse de manera alternativa utilizando el lenguaje "que consiste esencialmente en" o "que consiste en".

Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad con el fin de describir y divulgar las metodologías que se describen en las publicaciones, que podrían utilizarse en relación con la descripción del presente documento. Las publicaciones analizadas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a antedatar tal divulgación en virtud de la divulgación anterior.

Se ha descubierto que las enzimas que pertenecen a la clase cetorreductasa (KRED) o carbonilo reductasa (EC 1.1.1.184) son útiles para la conversión estereoselectiva de sustratos aldehído o cetona pro-estereoisoméricos en los correspondientes productos alcohol quiral. Las KRED por lo general convierten un sustrato cetona o aldehído en el producto alcohol correspondiente, pero también pueden catalizar la reacción inversa, la oxidación de un sustrato alcohol al producto cetona/aldehído correspondiente. La reducción de cetonas y aldehídos y la oxidación de alcoholes por enzimas tales como KRED requiere un cofactor, más comúnmente un dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) o un dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina reducido (NADPH), y un dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o un dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (NADP) para la reacción de oxidación. NADH y NADPH hacen de donantes de electrones, mientras que NAD y NADP hacen de aceptores de electrones.

Las KRED se utilizan cada vez más para la conversión estereoselectiva de cetonas y aldehídos en compuestos alcoholes quirales utilizados en la producción de compuestos farmacéuticos clave. Los ejemplos que utilizan las KRED para generar compuestos químicos útiles incluyen la reducción asimétrica de ésteres de 4-cloroacetoacetato (Zhou, J. Am. Chem. Soc. 1983 105:5925-5926; Santaniello, J. Chem. Res. (S) 1984:132-133; patente de Estados Unidos nº 5.559.030; patente de Estados Unidos nº 5.700.670 y patente de Estados Unidos nº 5.891.685), la reducción de ácidos dioxocarboxílicos (por ejemplo, patente de Estados Unidos nº 6.399.339), la reducción de (S) cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo (por ejemplo, patente de Estados Unidos nº 6.645.746 y documento WO 01/40450), la reducción de compuestos a base de pirrolotriazina (por ejemplo, solicitud de Estados Unidos nº 2006/0286646); la reducción de acetofenonas sustituidas (por ejemplo, patente de EE.UU. nº 6.800.477); y la reducción de cetotiolanos (WO 2005/054491). En otro enfoque, como se demuestra en el presente documento, la cetorreducción puede llevarse a cabo en presencia de un alcohol, tal como isopropanol, para proporcionar un sustrato para la reacción inversa (deshidrogenación del alcohol). De esta manera, el NADH/NADPH consumido en la reacción de cetorreducción se regenera mediante la reacción oxidativa inversa.

La divulgación se refiere a un polipéptido con actividad cetorreductasa. En una forma de realización, el polipéptido con actividad cetorreductasa se deriva del organismo *Lactobacillus kefir*.

A. Definiciones

El término "derivado" se refiere a que el polipéptido está modificado en su estructura primaria, secundaria o terciaria para que contenga una o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos, y pero comprende al menos un 50% o más de la secuencia primaria de la cetorreductasa de *L. kefir* (la proteína, hebra o polipéptido parental).

Una proteína, enzima, polinucleótido, gen o célula "parental", es cualquier proteína, enzima, polinucleótido, gen o célula de los que se deriva o se genera cualquier otra proteína, enzima, polinucleótido, gen o célula, utilizando cualquier método, herramienta o técnica, y sea o no el propio precursor original o mutante. Un polinucleótido o gen parental codifica una proteína o enzima parental.

Una "mutación" se refiere a cualquier proceso o mecanismo que dé como resultado una proteína, enzima, polinucleótido, gen o célula mutante con respecto a una proteína, polinucleótido, gen o célula parental. Esto incluye cualquier mutación en la que se modifica una proteína, enzima, polinucleótido o secuencia génica. Por lo general, la mutación dará como resultado un cambio detectable en la actividad biológica de una célula, enzima o polipéptido

(por ejemplo, la estabilidad, la inhibición, el recambio etc. de la enzima). Por lo general, una mutación se produce en un polinucleótido o secuencia génica por mutaciones, deleciones o inserciones puntuales de residuos de nucleótidos individuales o múltiples. Una mutación incluye modificaciones de polinucleótidos que aparecen dentro de una región codificante de proteínas de un gen, así como modificaciones en regiones fuera de una secuencia codificante de proteínas, tales como, pero sin limitarse a, secuencias reguladoras o promotoras. Una mutación en un gen puede ser "silenciosa", es decir, no se refleja en una modificación de aminoácidos después de la expresión, lo que lleva a una variante "conservadora de secuencia" del gen. Esto aparece generalmente cuando un aminoácido corresponde a más de un codón.

Los ejemplos no limitativos de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glicosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (por ejemplo, farnesilado, geranil-geranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido pegilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado, y similares. La literatura está repleta de referencias adecuadas para guiar a un experto en la modificación de los aminoácidos. Se encuentran protocolos de ejemplo en Walker (1998) Protein Protocols en CD-ROM (Humana Press, Towata, N.J.).

Un "polipéptido manipulado" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia variante generada mediante manipulación humana (por ejemplo, una secuencia generada mediante evolución dirigida de una enzima parental natural o de una variante derivada anteriormente de una enzima natural). Por lo general, un polipéptido manipulado se deriva de un polipéptido parental que tiene cierto grado de actividad. El polipéptido parental puede ser un polipéptido de tipo silvestre obtenido de un organismo, o un polipéptido manipulado derivado anteriormente. Como se describe en el presente documento, los genes que codifican los polipéptidos manipulados pueden clonarse y someterse a rondas adicionales de manipulación (por ejemplo, evolución dirigida) para obtener otro polipéptido manipulado que tenga una actividad o especificidad de sustrato deseados. Por lo tanto, un polipéptido parental puede ser una enzima cetorreductasa que se ha sometido anteriormente a una o más rondas de manipulación para mejorar o modificar la actividad enzimática. La presente divulgación proporciona polipéptidos manipulados que tienen al menos actividad cetorreductasa capaces de convertir el compuesto (2) en el compuesto (1), pero pueden tener actividad o especificidad de sustrato adicionales.

"Proteína", "polipéptido" y "péptido" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de al menos dos aminoácidos unidos covalentemente mediante un enlace amida, independientemente de la longitud o la modificación posterior a la traducción (por ejemplo, glicosilación, fosforilación, lipidación, miristilación, ubiquitinación, etc.). Se incluyen dentro de esta definición los D-aminoácidos y L-aminoácidos, y las mezclas de D-aminoácidos y L-aminoácidos.

"Polinucleótidos" u "oligonucleótidos" se refieren a polímeros u oligómeros de bases nitrogenadas en los que las bases nitrogenadas están conectadas por enlaces azúcar-fosfato (esqueleto de azúcar-fosfato). Las bases nitrogenadas o bases incluyen restos heterocíclicos naturales y sintéticos comúnmente conocidos para quienes utilizan la tecnología de ácidos nucleicos o polinucleótidos, o utilizan la tecnología de ácidos nucleicos peptídicos o de poliamida para generar así polímeros que pueden hibridar con los polinucleótidos de manera específica de secuencia. Los ejemplos no limitativos de bases nitrogenadas incluyen: adenina, citosina, guanina, timina, uracilo, 5-propinil-uracilo, 2-tio-5-propinil-uracilo, 5-metilcitosina, pseudoisocitosina, 2-tiouracilo y 2-tiotimina, 2-aminopurina, N9-(2-amino-6-cloropurina), N9-(2,6-diaminopurina), hipoxantina, N9-(7-deaza-guanina), N9-(7-deaza-8-aza-guanina) y N8-(7-deaza-8-aza-adenina). Los polinucleótidos y oligonucleótidos ejemplares incluyen polímeros de 2'-desoxirribonucleótidos (ADN) y polímeros de ribonucleótidos (ARN). Un polinucleótido puede estar compuesto totalmente por ribonucleótidos, totalmente por 2'-desoxirribonucleótidos o combinaciones de los mismos.

"Secuencia codificante" se refiere a la porción de un polinucleótido (por ejemplo, un gen) que codifica un polipéptido.

"Natural" o "de tipo silvestre" se refiere a la forma que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia polinucleotídica natural o de tipo silvestre es una secuencia presente en un organismo que puede aislarse de una fuente que se encuentra en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionadamente mediante manipulación humana. En una forma de realización, el polipéptido cetorreductasa natural que se utiliza en los métodos de la divulgación comprende una secuencia como la presentada en la SEQ ID NO: 2 y que está codificada por el polinucleótido de la SEQ ID NO: 1.

"Porcentaje de identidad de secuencia", "porcentaje de identidad", e "idéntica en un.....por ciento" se utilizan en el presente documento para referirse a las comparaciones entre secuencias polinucleotídicas o secuencias polipeptídicas, y se determinan comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico o residuo de aminoácido idéntico aparece en ambas secuencias o una base de ácido nucleico o residuo de aminoácido está alineado con un hueco para dar 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 dar el porcentaje de identidad de secuencia. La determinación del

alineamiento óptimo y el porcentaje de identidad de secuencia se realiza utilizando los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 (véase, por ejemplo, Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul *et al.*, 1977, Nucleic Acids Res. 3389-3402). El software para realizar el análisis BLAST está a disposición del público a través de la página web del National Center for Biotechnology Information.

En resumen, los análisis BLAST implican identificar primero pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que coinciden o satisfacen alguna puntuación T con umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul *et al.*, *supra*). Estos éxitos de la palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. A continuación, los aciertos de palabras se prolongan en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias nucleotídicas, 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 de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La prolongación de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada disminuye la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias nucleotídicas) utiliza como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$, y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:10915).

Hay otros algoritmos disponibles que funcionan de forma similar a BLAST para proporcionar el porcentaje de identidad de dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:2444, mediante aplicaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software GCG Wisconsin), o mediante inspección visual (véase en general, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (suplemento de 1995) (Ausubel)). Además, la determinación del alineamiento de secuencia y del porcentaje de identidad de secuencia puede emplear los programas BESTFIT o GAP en el paquete de software GCG Wisconsin (Accelrys, Madison WI), utilizando los parámetros por defecto proporcionados.

"Secuencia de referencia" se refiere a una secuencia definida con la que se compara una secuencia modificada. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, un segmento de una secuencia polipeptídica o gen de longitud completa. Generalmente, una secuencia de referencia tiene al menos 20 residuos de aminoácidos o nucleótidos de longitud, al menos 25 residuos de longitud, al menos 50 residuos de longitud, o la longitud completa 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) puede comprender adicionalmente una secuencia que es divergente entre las dos secuencias, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos o polipéptidos se realizan por lo general comparando las secuencias de los dos polinucleótidos sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La expresión "secuencia de referencia" no pretende limitarse a las secuencias de tipo silvestre, y puede incluir secuencias manipuladas o modificadas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una secuencia de referencia puede ser una secuencia de aminoácidos manipulada o modificada anteriormente.

"Ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos aproximadamente 20 residuos de aminoácidos o posiciones de nucleótidos contiguos en la que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia de al menos 20 aminoácidos o nucleótidos contiguos y en la que la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La ventana de comparación puede tener una longitud superior a 20 residuos contiguos, e incluye, opcionalmente 30, 40, 50, 100, o ventanas más largas.

"Identidad sustancial" se refiere a una secuencia polinucleotídica o polipeptídica que tiene al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia, al menos un 85 por ciento de identidad de secuencia, al menos un 89 por ciento de identidad de secuencia, al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia, e incluso al menos un 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de residuo, con frecuencia sobre una ventana de al menos 30-50 residuos, en la que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con una secuencia que incluye deleciones o adiciones que suman el 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia sobre la ventana

de comparación. En formas de realización específicas aplicadas a los polipéptidos, la expresión "identidad sustancial" se refiere a que dos secuencias polipeptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando pesos de hueco por defecto, comparten al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 89 por ciento de identidad de secuencia, al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, un 99 por ciento de identidad de secuencia). Preferentemente, las posiciones de residuo que no son idénticas difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos.

"Estereoselectividad" o "estereoespecificidad" se refieren a la formación preferencial en una reacción química o enzimática de un estereoisómero frente a otro. La estereoselectividad puede ser parcial, cuando se favorece la formación de un estereoisómero frente al otro, o puede ser completa, cuando sólo se forma un estereoisómero. Cuando los estereoisómeros son enantiómeros, la estereoselectividad se denomina enantioselectividad, la fracción (por lo general presentada como porcentaje) de un enantiómero en la suma de ambos. En la técnica se presenta comúnmente, de manera alternativa, (por lo general como porcentaje) como exceso enantiomérico (e.e.) calculado a partir de la misma según la fórmula $(\text{enantiómero principal} - \text{enantiómero minoritario}) / (\text{enantiómero principal} + \text{enantiómero minoritario})$. Cuando los estereoisómeros son diastereoisómeros, la estereoselectividad se denomina a veces diastereoselectividad, la fracción (por lo general presentada como un porcentaje) de un diastereómero en una mezcla de dos diastereómeros, presentada comúnmente de manera alternativa como exceso diastereomérico (d.e.). El exceso enantiomérico y el exceso diastereomérico son tipos de exceso estereomérico.

"Altamente estereoselectiva" o "altamente estereoespecífica" se refiere a una reacción química o enzimática que es capaz de convertir preferentemente un sustrato en su producto correspondiente con al menos un 85% de exceso estereomérico.

"Propiedad enzimática mejorada" se refiere a cualquier propiedad enzimática que se mejora o se hace más deseable para un fin concreto en comparación con la propiedad que se encuentra en una enzima de referencia. Para un polipéptido manipulado con actividad cetorreductasa descrito en el presente documento, la comparación se hace generalmente con respecto a una enzima cetorreductasa de tipo silvestre (por ejemplo, una cetorreductasa de *L. kefir* (KRED)), aunque en algunas formas de realización, la cetorreductasa de referencia puede ser otra cetorreductasa manipulada mejorada. Las propiedades enzimáticas para las que es deseable la mejora incluyen, pero no se limitan a, la actividad enzimática (que puede expresarse en términos de porcentaje de conversión del sustrato en un período de tiempo), la estabilidad térmica, la estabilidad frente al pH o el perfil de actividad, los requisitos de cofactor, la refractariedad a inhibidores (por ejemplo, la retroinhibición), la estereoespecificidad y la estereoselectividad (incluida la enantioselectividad). En algunas formas de realización, una especificidad de sustrato o producción del producto (no producido normalmente por la enzima de tipo silvestre) modificada es una propiedad enzimática mejorada.

"Aumento de la actividad enzimática" o "aumento de la actividad" o "aumento de la tasa de conversión" se refiere a una propiedad mejorada de una enzima manipulada, que puede estar representada por un aumento de la actividad específica (por ejemplo, producto producido/hora/peso de proteína) o un aumento del porcentaje de conversión del sustrato en producto (por ejemplo, el porcentaje de conversión de la cantidad inicial de sustrato en producto en un período de tiempo especificado utilizando una cantidad especificada de una cetorreductasa) en comparación con una enzima de referencia. En los Ejemplos se proporcionan métodos ejemplares para determinar la actividad enzimática y la tasa de conversión. Cualquier propiedad relacionada con la actividad enzimática puede verse influida, incluidas las propiedades enzimáticas clásicas de K_m , V_{max} o k_{cat} , cuyos cambios pueden conducir a un aumento de la actividad enzimática. Las mejoras de la actividad enzimática pueden ser de aproximadamente el 100% mejorada frente a la actividad enzimática de la correspondiente cetorreductasa de tipo silvestre, hasta tanto como el 200%, 500%, 1.000%, o más, frente a la actividad enzimática de las cetorreductasas naturales u otra R-alcohol deshidrogenasa manipulada de la que se deriva un polipéptido manipulado. En formas de realización específicas, las enzimas manipuladas de la divulgación presentan una mejora de la actividad enzimática en el intervalo comprendido entre un 100% y un 200%, un 200% y un 1.000% o una mejora superior al 1.500% frente a la de la enzima parental, de tipo silvestre u otra enzima de referencia. El experto en la materia entiende que la actividad de cualquier enzima está limitada por la difusión de manera que la velocidad de recambio catalítico no puede superar la velocidad de difusión del sustrato, incluido cualquier cofactor necesario. Por lo tanto, cualquier mejora de la actividad enzimática de una cetorreductasa tendrá un límite superior relacionado con la velocidad de difusión de los sustratos sobre los que actúa la cetorreductasa. La actividad cetorreductasa puede medirse mediante cualquiera de los ensayos convencionales utilizados para medir la actividad alcohol deshidrogenasa, tal como la condición de ensayo que se describe más adelante. Las comparaciones de las actividades enzimáticas o las tasas de conversión se realizan utilizando una preparación definida de enzima, un ensayo definido en condiciones establecidas, y uno o más sustratos definidos, como se describe adicionalmente detalladamente en el presente documento. Generalmente, cuando se comparan lisados, se determina el número de células y/o la cantidad de proteína ensayada así como el uso de sistemas de expresión idénticos y células hospedadoras idénticas para reducir al mínimo las variaciones en la cantidad de enzima producida por las células hospedadoras y presente en los lisados.

"Conversión" se refiere a la transformación enzimática de un sustrato en el correspondiente producto. "Porcentaje de conversión" se refiere al porcentaje del sustrato que se convierte en el producto dentro de un período de tiempo en

unas condiciones especificadas. Por lo tanto, por ejemplo, la "actividad" o la "tasa de conversión" de un polipéptido cetereductasa puede expresarse como el "porcentaje de conversión" del sustrato en producto.

- 5 "Termoestable" o "estable térmicamente" se utilizan indistintamente para referirse a un polipéptido que es resistente a la inactivación cuando se expone a temperaturas superiores a la ambiental (por ejemplo, 30°C-80°C) durante un período de tiempo (por ejemplo, 0,5-24 horas) en comparación con la enzima no tratada, conservando así un determinado nivel de actividad residual (más del 60% al 80%, por ejemplo) después de la exposición a las temperaturas elevadas.
- 10 "Estable frente a disolventes" se refiere a un polipéptido que mantiene una actividad similar (más de, por ejemplo, el 60% al 80%) después de la exposición a concentraciones variables (por ejemplo, 5%-99%) de disolvente, (por ejemplo, alcohol isopropílico, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, acetona, tolueno, acetato de butilo, metil terc-butil éter, acetonitrilo, etc.) durante un período de tiempo (por ejemplo, 0,5-24 horas) en comparación con la enzima no tratada.
- 15 "Estable frente al pH" se refiere a un polipéptido que mantiene una actividad similar (por ejemplo, más del 60% al 80%) después de la exposición a un pH alto o bajo (por ejemplo, de 8 a 12 ó 4,5-6) durante un período de tiempo (por ejemplo 0,5-24 horas) en comparación con la enzima no tratada.
- 20 "Termoestable y estable frente a disolventes" se refiere a un polipéptido que es tanto termoestable como estable frente a disolventes.
- 25 "Aminoácido" o "residuo" tal como se utiliza en el contexto de los polipéptidos descritos en el presente documento se refiere al monómero específico en una posición de secuencia en un polipéptido o polímero de aminoácidos.
- 30 "Aminoácido o residuo hidrófilo" se refiere a un aminoácido o residuo que tiene una cadena lateral que presenta una hidrofobicidad inferior a cero según la escala de hidrofobicidad consenso normalizada de Eisenberg *et al.*, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Los aminoácidos hidrófilos codificados genéticamente 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).
- 35 "Aminoácido o residuo ácido" se refiere a un aminoácido o residuo hidrófilo que tiene una cadena lateral que presenta un valor de pK inferior a aproximadamente 6 cuando el aminoácido está incluido en un péptido o polipéptido. Los aminoácidos ácidos tienen por lo general cadenas laterales cargadas negativamente a pH fisiológico debido a la pérdida de un ion hidrógeno. Los aminoácidos ácidos codificados genéticamente incluyen L-Glu (E) y L-Asp (D).
- 40 "Aminoácido o residuo básico" se refiere a un aminoácido o residuo hidrófilo que tiene una cadena lateral que presenta un valor de pK superior a aproximadamente 6 cuando el aminoácido está incluido en un péptido o polipéptido. Los aminoácidos básicos tienen por lo general cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico debido a la asociación con el ion hidronio. Los aminoácidos básicos codificados genéticamente incluyen L-Arg (R) y L-Lys (K).
- 45 "Aminoácido o residuo polar" se refiere a un aminoácido o residuo hidrófilo que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene al menos un enlace en el que el par de electrones compartido entre dos átomos es sujetado más firmemente por uno de los átomos. Los aminoácidos polares codificados genéticamente incluyen L-Asn (N), L-Gln (Q), L-Ser (S) y L-Thr (T).
- 50 "Aminoácido o residuo hidrófobo" se refiere a un aminoácido o residuo que tiene una cadena lateral que presenta una hidrofobicidad superior a cero según la escala de hidrofobicidad consenso normalizada de Eisenberg *et al.*, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Los aminoácidos hidrófobos 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).
- 55 "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. Los aminoácidos aromáticos codificados genéticamente incluyen 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 residuo básico, o como residuo aromático ya que su cadena lateral incluye un anillo heteroaromático, en el presente documento la histidina se clasifica como residuo hidrófilo o como "residuo restringido".
- 60 "Aminoácido o residuo restringido" se refiere a un aminoácido o residuo que tiene una geometría restringida. En el presente documento, los residuos restringidos incluyen L-Pro (P) y L-His (H). La histidina tiene una geometría restringida porque tiene un anillo imidazol relativamente pequeño. La prolina tiene una geometría restringida porque también tiene un anillo de cinco miembros.
- 65 "Aminoácido o residuo no polar" se refiere a un aminoácido o residuo hidrófobo que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico y que tiene enlaces en los que el par de electrones compartido entre dos átomos es

sujetado generalmente por igual por cada uno de los dos átomos (es decir, la cadena lateral no es polar). Los aminoácidos no polares codificados genéticamente incluyen L-Gly (G), L-Leu (L), L-Val (V), L-Ile (I), L-Met (M) y L-Ala (A).

5 "Aminoácido o residuo alifático" se refiere a un aminoácido o residuo hidrófobo que tiene una cadena lateral hidrocarbonada alifática. Los aminoácidos alifáticos codificados genéticamente incluyen L-Ala (A), L-Val (V), L-Leu (L) y L-Ile (I).

10 La "cisteína" o aminoácido L-cisteína (C) es inusual en cuanto a que puede formar puentes disulfuro con otros aminoácidos L-Cys (C) u otros aminoácidos que contienen sulfanilo o sulfhidrilo. Los "residuos tipo cisteína" incluyen cisteína y otros aminoácidos que contienen restos sulfhidrilo que están disponibles para la formación de puentes disulfuro. La capacidad de L-Cys (C) (y otros aminoácidos con cadenas laterales que contienen -SH) de existir en un péptido tanto en la forma oxidada con puentes disulfuro o reducida con grupos -SH libres influye en si L-Cys (C) contribuye al carácter hidrófobo o hidrófilo neto de un péptido. Aunque L-Cys (C) presenta una hidrofobicidad de 0,29 según la escala consenso normalizada de Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1984, *supra*), debe entenderse que para los fines de la presente divulgación L-Cys (C) se clasifica en su propio grupo único.

15 "Aminoácido o residuo pequeño" se refiere a un aminoácido o residuo que tiene una cadena lateral que está compuesta por un total de tres o menos carbonos y/o heteroátomos (excepto el carbono α y los hidrógenos). Los aminoácidos o residuos pequeños pueden clasificarse adicionalmente como aminoácidos o residuos pequeños alifáticos, no polares, polares o ácidos, según las definiciones anteriores. Los aminoácidos pequeños codificados genéticamente incluyen L-Ala (A), L-Val (V), L-Cys (C), L-Asn (N), L-ser (S), L-Thr (T) y L-Asp (D).

20 "Aminoácido o residuo que contiene hidroxilo" se refiere a un aminoácido que contiene un resto hidroxilo (-OH). Los aminoácidos que contienen hidroxilo codificados genéticamente incluyen L-Ser (S), L-Thr (T) y L-Tyr (Y).

25 "Diferencia de aminoácido" o "diferencia de residuo" se refiere a un cambio en el residuo en una posición especificada de una secuencia polipeptídica cuando se compara con una secuencia de referencia. Por ejemplo, una diferencia de residuo en la posición S96L, donde la secuencia de referencia tiene una serina, se refiere a un cambio del residuo en la posición S96 a una leucina. Como se describe en el presente documento, un polipéptido manipulado con actividad cetorreductasa puede incluir una o más diferencias de residuo con respecto a una secuencia de referencia, donde las múltiples diferencias de residuo se indican por lo general mediante una lista de posiciones especificadas donde los cambios se hacen con respecto a la secuencia de referencia (por ejemplo, "una o más diferencias de residuo en comparación con la SEQ ID NO: 2 en las siguientes posiciones de residuo: I11, A64, T76, V95, S96, V99, E145, F147, V148, T152, L153, S159, Y190, D197, E200, A202, M206, Y249").

30 "Correspondiente a", "referencia a" o "con respecto a" cuando se utilizan en el contexto de la numeración de una secuencia determinada de aminoácidos o polinucleotídica se refiere a la numeración de los residuos de una secuencia de referencia especificada cuando la secuencia determinada de aminoácidos o polinucleotídica se compara con la secuencia de referencia. En otras palabras, el número de residuo o posición de residuo de un polímero determinado se designa con respecto a la secuencia de referencia más que por la posición numérica real del residuo dentro de la secuencia determinada de aminoácidos o polinucleotídica. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos determinada, tal como la de un polipéptido manipulado, puede alinearse con una secuencia de referencia introduciendo huecos para optimizar las coincidencias de residuos entre las dos secuencias. En estos casos, aunque haya huecos, la numeración del residuo en la secuencia determinada de aminoácidos o polinucleotídica se hace con respecto a la secuencia de referencia con la que se ha alineado.

35 "Posición correspondiente a" tal como se utiliza en el presente documento en el contexto de identificar la posición de una diferencia de residuo (por ejemplo, una sustitución) en una secuencia de aminoácidos de una reductasa manipulada se refiere a la posición equivalente en la secuencia de referencia y no debe quedar limitada en absoluto por el sistema de numeración. Por ejemplo, tal como cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34. Las posiciones de residuo de los aminoácidos de estos polipéptidos se numeran comenzando con el residuo metionina iniciadora (M) como posición de residuo 1. Sin embargo, se contempla (y el experto en la materia entenderá) que este residuo metionina iniciadora puede ser eliminado por la maquinaria de procesamiento biológico, tal como en una célula hospedadora o en el sistema de traducción *in vitro*, para generar un polipéptido maduro que carece del residuo metionina iniciadora numerado "posición 1". Por consiguiente, la expresión "diferencia de residuo en la posición correspondiente a X de la SEQ ID NO: 2" tal como se utiliza en el presente documento puede referirse a la posición X en la cetorreductasa de *L. kefir* o a la posición equivalente X-1 en una cetorreductasa que haya sido procesada de manera que carece de la metionina iniciadora.

La posición de la secuencia polipeptídica en la que hay un aminoácido o cambio de aminoácido particular ("diferencia de residuo") se describe a veces en el presente documento como "X_n", o "posición n", donde *n* se refiere a la posición de residuo con respecto a la secuencia de referencia. Una mutación de sustitución específica, que es una sustitución del residuo específico en una secuencia de referencia con un residuo especificado diferente, puede indicarse mediante la notación convencional "X(número)Y", donde X es el identificador de una sola letra del residuo en la secuencia de referencia, "número" es la posición de residuo en la secuencia de referencia (por ejemplo, la cetorredutasa de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2), e Y es el identificador de una sola letra de la sustitución de residuo en la secuencia manipulada. En algunas formas de realización descritas en el presente documento, la diferencia de residuo de aminoácido correspondiente a una posición de aminoácido se indica de manera diferente debido a la diferente secuencia de referencia aunque corresponda a una posición equivalente. Por ejemplo, una "diferencia de residuo en la posición Y190 de la SEQ ID NO: 2" es equivalente a una "diferencia de residuo en la posición C190 de la SEQ ID NO: 4".

Una sustitución (o mutación) "conservadora" de aminoácidos se refiere a la sustitución de un residuo con un residuo que tiene una cadena lateral similar, y por lo tanto implica por lo general la sustitución del aminoácido en el polipéptido con aminoácidos dentro de la misma clase de aminoácidos definida o una similar. Tal como se utiliza en el presente documento, en algunas formas de realización, las mutaciones conservadoras no incluyen sustituciones de un residuo hidrófilo a hidrófilo, hidrófobo a hidrófobo, que contiene hidroxilo a que contiene hidroxilo, pequeño a pequeño. Además, tal como se utiliza en el presente documento, una mutación conservadora puede ser una sustitución de un residuo alifático a uno alifático, no polar a no polar, polar a polar, ácido a ácido, básico a básico, aromático a aromático, o restringido a restringido. La siguiente Tabla 1 muestra las sustituciones conservadoras ejemplares.

Tabla 1: Sustituciones conservadoras

Residuo	Mutaciones conservadoras posibles
A, L, V, I	Otro alifático (A, L, V, I) Otro no-polar (A, L, V, I, G, M)
G, M	Otro no-polar (A, L, V, I, G, M)
D, E	Otro ácido (D, E)
K, R	Otro básico (K, R)
P, H	Otro restringido (P, H)
N, Q, S, T	Otro polar (N, Q, S, T)
Y, W, F	Otro aromático (Y, W, F)
C	Ninguno

Por lo tanto, en determinadas formas de realización, las "sustituciones conservadoras de aminoácidos" de una secuencia polipeptídica enumerada (por ejemplo, las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34) pueden incluir sustituciones de un porcentaje, por lo general inferior al 30% (por ejemplo, inferior al 20% o inferior al 10%), de la secuencia de aminoácidos con un aminoácido del mismo grupo de sustituciones conservadoras. Por consiguiente, una variante sustituida de manera conservadora de un polipéptido de la divulgación puede contener 100, 75, 50, 25, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 aminoácidos sustituidos con un aminoácido del mismo grupo de sustituciones conservadoras.

Las "variantes conservadoras" son polipéptidos en los que se han cambiado uno o más residuos de aminoácidos sin modificar la conformación y función globales del polipéptido del que se derivan, incluidas, pero no limitadas a, sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por lo general, una variante conservadora tiene diferencias de residuo de aminoácido en posiciones distintas de las indicadas como posiciones que se conservan. Por consiguiente, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre una enzima y una variante conservadora de esa enzima que tiene una función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, al menos un 30%, al menos un 50%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99%.

"Sustituciones no conservadoras" de un polipéptido son aquellas sustituciones que no se caracterizan como una sustitución conservadora. Por ejemplo, cualquier sustitución que cruce los límites de los grupos expuestos anteriormente en la Tabla 1. Estos incluyen sustituciones de aminoácidos neutros por aminoácidos básicos o ácidos, (por ejemplo, Val, Ile, Leu o Met por Asp, Glu, Asn, o Gln), aminoácidos ácidos o básicos por aminoácidos aromáticos (por ejemplo, Asp, Asn, Glu o Gln por Phe, Tyr o Trp) o cualquier otra sustitución que no sustituya un aminoácido con un aminoácido similar. Las cadenas laterales básicas incluyen lisina (K), arginina (R), histidina (H); las cadenas laterales ácidas incluyen ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); las cadenas laterales polares no cargadas incluyen glicina (G), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), tirosina (Y), cisteína (C); las cadenas laterales no polares incluyen alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), fenilalanina (F), metionina (M), triptófano (W); las cadenas laterales ramificadas en beta incluyen treonina (T), valina (V), isoleucina (I); las cadenas laterales aromáticas incluyen tirosina (Y), fenilalanina (F), triptófano (W), histidina (H).

Un grupo "Z" (por ejemplo, un grupo designado Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6 y Z7) tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un conjunto específico de aminoácidos que pueden sustituirse en una posición designada en

un polipéptido y que pueden incluir sustituciones de aminoácidos tanto conservadoras como no conservadoras. Por ejemplo, la sustitución en residuos específicos en un polipéptido puede estar limitada a los aminoácidos específicos enumerados en un grupo "Z". Los grupos Z útiles con los polipéptidos de la presente divulgación se enumeran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2: Grupos Z utilizados para identificar los grupos para las sustituciones

Designación del grupo Z	Aminoácidos en el grupo Z
Z1	alanina (A), leucina (L), isoleucina (I), y valina (V)
Z2	alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), glicina (G) o metionina (M)
Z3	lisina (K) o arginina (R)
Z4	tirosina (Y), fenilalanina (F) o triptófano (W)
Z5	asparagina (N), glutamina (Q), serina (S) o treonina (T)
Z6	ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E)
Z7	prolina (P) o histidina (H)

Por consiguiente, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede incluir aminoácidos que están "limitados" a sustituciones de aminoácidos concretas. Por ejemplo, las diferencias de residuo en las posiciones de la SEQ ID NO: 4 correspondientes a 11, 64, 76, 95, 96, 99, 145, 147, 148, 152, 153, 159, 190, 197, 200, 202, 206, o 249 pueden estar limitadas a las sustituciones específicas establecidas en cualquiera de los grupos Z1-Z7 como se ha definido anteriormente en la Tabla 2, y en otro lugar de la memoria descriptiva. Se entiende que no es necesario modificar en el mismo polipéptido todos los residuos limitados identificados. En algunas formas de realización, sólo aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% de los residuos de aminoácidos limitados están modificados en un polipéptido determinado.

La presente divulgación también contempla mutaciones basadas en ubicaciones o regiones en la estructura del polipéptido parental. Por consiguiente, con referencia a la Tabla 3, una variante de un polipéptido parental (por ejemplo, la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34) puede incluir una sustitución de aminoácido en un residuo concreto, situado en una región del polipéptido parental en la que la ubicación se identifica como se describe en la Tabla 3. En la Tabla 3 también se identifican las sustituciones ejemplares en cada una de las ubicaciones pertinentes.

Tabla 3: Ubicaciones en la enzima útiles para las sustituciones

Ubicación en la enzima	Mutación específica (con respecto a la SEQ ID NO: 2)
Sitio no activo; interno	I11L
Sitio no activo; interno	A64V
Superficie	T76I
Sitio no activo; interno	V95M
Sitio activo	S96L
Interfaz del tetrámero	V99L
Sitio activo	E145A
Interfaz del tetrámero	F147L/I
Sitio activo	V148I
Sitio activo	T152A
Sitio activo	L153M
Sitio no activo; interno	S159T
Sitio activo	Y190C/G
Superficie	D197A
Sitio activo	E200P
Sitio activo	A202F
Sitio activo	M206C
Sitio activo	Y249F

"Delección" se refiere a la modificación del polipéptido mediante la eliminación de uno o más aminoácidos del polipéptido parental o de referencia. Las delecciones pueden comprender la eliminación de 1 o más aminoácidos, 2 o más aminoácidos, 3 o más aminoácidos, 4 o más aminoácidos, 5 o más aminoácidos, 6 o más aminoácidos, 7 o más aminoácidos, 8 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos, 12 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos, ó 20 o más aminoácidos, hasta un 10% del número total de aminoácidos, o hasta un 20% del número total de los aminoácidos que constituyen la enzima de referencia, al tiempo que conserva la actividad enzimática y/o conserva las propiedades mejoradas de una enzima cetorreductasa manipulada. Las delecciones pueden dirigirse a las porciones internas y/o porciones terminales del polipéptido. En diversas formas de realización, la delección puede comprender un segmento continuo o puede ser discontinua.

- "Inserción" se refiere a la modificación del polipéptido mediante la adición de uno o más aminoácidos a partir del polipéptido de referencia. En algunas formas de realización, las enzimas manipuladas de la divulgación pueden comprender inserciones de uno o más aminoácidos en el polipéptido cetorreductasa natural, así como inserciones de uno o más aminoácidos en otros polipéptidos manipulados con actividad cetorreductasa. Las inserciones pueden estar en las porciones internas del polipéptido, o en el extremo carboxilo o amino terminal. Las inserciones tal como se utiliza en el presente documento incluyen polipéptidos de fusión como se conoce en la técnica. La inserción puede ser un segmento contiguo de aminoácidos o estar separada por uno o más de los aminoácidos en el polipéptido natural.
- "Fragmento" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino terminal y/o carboxilo terminal, pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia. Los fragmentos pueden tener una longitud de al menos 14 aminoácidos, una longitud de al menos 20 aminoácidos, una longitud de al menos 50 aminoácidos o más, y hasta un 70%, 80%, 90%, 95%, 98% y 99% de un polipéptido de longitud completa de la divulgación. En alguna forma de realización, el fragmento es biológicamente activo y puede tener una o más actividades del polipéptido original o de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de la divulgación comprenderá la actividad cetorreductasa. La actividad biológica puede no ser idéntica (por ejemplo, la actividad enzimática puede ser diferente) con respecto al polipéptido de longitud completa.
- "Polipéptido aislado" o "polinucleótido aislado" se refiere a un polipéptido o polinucleótido que está sustancialmente separado de otros contaminantes que lo acompañan de forma natural, por ejemplo, proteínas, lípidos y polinucleótidos. La expresión abarca polipéptidos que se han extraído o purificado a partir de su sistema de expresión o entorno natural (por ejemplo, síntesis *in vitro* o célula hospedadora). Las enzimas cetorreductasa de la divulgación pueden estar presentes dentro de una célula, presentes en el medio celular, o prepararse de diversas formas, tales como lisados o preparaciones aisladas.
- "Polipéptido sustancialmente puro" se refiere a una composición en la que la especie de polipéptido es la especie predominante presente (por ejemplo, en base a la molaridad o al peso, es más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual en la composición), y es generalmente una composición sustancialmente purificada cuando la especie objeto comprende al menos aproximadamente un 50 por ciento de las especies macromoleculares presentes en moles o % en peso. En general, una preparación de enzima sustancialmente pura comprenderá aproximadamente un 60% o más, aproximadamente un 70% o más, aproximadamente un 80% o más, aproximadamente un 90% o más, aproximadamente un 95% o más, y aproximadamente un 98% o más, de todas las especies macromoleculares en moles o % en peso presentes en la composición. En algunas formas de realización, la especie objeto se purifica a homogeneidad esencial (es decir, no pueden detectarse especies contaminantes en la composición mediante los métodos de detección convencionales), en la que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular. Las especies de disolventes, las moléculas pequeñas (< 500 daltons), y las especies de iones elementales no se consideran especies macromoleculares.
- "Hibridación rigurosa" se utiliza en el presente documento para referirse a condiciones en las cuales los híbridos de ácidos nucleicos son estables. Como conocen los expertos en la materia, la estabilidad de los híbridos se refleja en la temperatura de fusión (T_m) de los híbridos. En general, la estabilidad de un híbrido está en función de la fuerza iónica, la temperatura, el contenido de G/C, y la presencia de agentes caotrópicos. Los valores de T_m para los polinucleótidos pueden calcularse utilizando métodos conocidos para predecir las temperaturas de fusión (véase, por ejemplo, Baldino *et al.*, Methods Enzymology 168:761-777; Bolton *et al.*, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 48:1390; Bresslauer *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 83:8893-8897; Freier *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 83:9373-9377; Kierzek *et al.*, Biochemistry 25:7840-7846; Rychlik *et al.*, 1990, Nucleic Acids Res. 18:6409-6412 (errata, 1991, Nucleic Acids Res. 19:698); Sambrook *et al.*, *supra*; Suggs *et al.*, 1981, In Developmental Biology Using Purified Genes (Brown *et al.*, eds.), págs. 683-693, Academic Press; y Wetmur, 1991, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26:227-259. Todas las publicaciones se incorporan en el presente documento por referencia). En algunas formas de realización, el polinucleótido codifica el polipéptido descrito en el presente documento e hibrida en condiciones definidas, tales como condiciones moderadamente rigurosas o muy rigurosas, con el complemento de una secuencia que codifica un polipéptido manipulado con actividad cetorreductasa.
- "Rigurosidad de hibridación" se refiere a tales condiciones de lavado de ácidos nucleicos. En general, las reacciones de hibridación se realizan en condiciones de rigurosidad más baja, seguido de lavados de diversas pero mayores rigurosidades. La expresión "hibridación moderadamente rigurosa" se refiere a condiciones que permiten que el ADN diana se una a un ácido nucleico complementario que tiene una identidad de aproximadamente un 60%, preferentemente una identidad de aproximadamente un 75%, una identidad de aproximadamente un 85% con el ADN diana, con una identidad superior a aproximadamente un 90% con el polinucleótido diana. "Hibridación muy rigurosa" se refiere generalmente a condiciones de aproximadamente 10°C o menos de la temperatura de fusión térmica T_m como se determina en la condición de solución para una secuencia polinucleotídica definida. En algunas formas de realización, una condición de alta rigurosidad se refiere a condiciones que permiten la hibridación de solamente aquellas secuencias de ácidos nucleicos que forman híbridos estables en NaCl 0,018 M a 65°C (es decir, si un híbrido no es estable en NaCl 0,018 M a 65°C, no será estable en condiciones de alta rigurosidad, tal como se contempla en el presente documento). Los ejemplos de condiciones moderadamente rigurosas son condiciones

equivalentes a la hibridación en formamida al 50%, 5X solución de Denhart, 5X SSPE, SDS al 0,2% a 42°C, seguido de lavado en 0,2 X SSPE, SDS al 0,2%, a 42°C. Pueden proporcionarse condiciones de alta rigurosidad ejemplares, por ejemplo, mediante hibridación en condiciones equivalentes a formamida al 50%, 5X solución de Denhart, 5X SSPE, SDS al 0,2% a 42°C, seguido de lavado en 0,1X SSPE, y SDS al 0,1% a 65°C. Otra condición de alta rigurosidad es la hibridación en condiciones equivalentes a la hibridación en 5X SSC que contiene SDS al 0,1% (p:v) a 65°C y lavado en 0,1X SSC que contiene SDS al 0,1% a 65°C. Se describen otras condiciones de hibridación de alta rigurosidad, así como condiciones moderadamente rigurosas, en las referencias citadas anteriormente.

"Con optimización de codones" se refiere a cambios en los codones del polinucleótido que codifica una proteína a los utilizados preferentemente en un organismo concreto, de manera que la proteína codificada se exprese de manera eficaz en el organismo de interés. Aunque el código genético está degenerado en cuanto a que la mayoría de los aminoácidos están representados por varios codones llamados codones "sinónimos", es bien sabido que el uso de codones por organismos concretos no es aleatorio y está sesgado hacia tripletes de codones concretos. Este sesgo en el uso de codones puede ser mayor en referencia a un determinado gen, genes de función común o de origen ancestral, proteínas altamente expresadas frente a proteínas con bajo número de copias, y las regiones codificantes de proteínas totales del genoma de un organismo. En algunas formas de realización, los polinucleótidos que codifican un polipéptido con actividad cetorreductasa de la divulgación pueden tener optimización de codones para la producción óptima a partir del organismo hospedador seleccionado para la expresión.

"Codones con sesgo en el uso de codones elevado, óptimo y preferente" se refiere indistintamente a los codones que se utilizan con mayor frecuencia en las regiones codificantes de proteínas que otros codones que codifican el mismo aminoácido. Los codones preferentes pueden determinarse con relación al uso de codones en un solo gen, un conjunto de genes de función o de origen común, genes altamente expresados, la frecuencia codónica en las regiones codificantes de proteínas totales de todo el organismo, la frecuencia codónica en las regiones codificantes de proteínas totales de organismos relacionados, o combinaciones de los mismos. Los codones cuya frecuencia aumenta en función del nivel de expresión génica son por lo general los codones óptimos para la expresión. Se conocen diversos métodos para determinar la frecuencia codónica (por ejemplo, el uso de codones, el uso relativo de codones sinónimos) y la preferencia codónica en organismos específicos, incluido el análisis multivariante, por ejemplo, mediante análisis por conglomerados o análisis de correspondencia, y el número efectivo de codones utilizados en un gen (véase GCG CodonPreference, Genetics Computer Group Wisconsin Package; CodonW, John Peden, Universidad de Nottingham; McInerney, J. O, 1998, *Bioinformatics* 14: 372-73; Stenico *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22:2437-46; Wright, F., 1990, *Gene* 87:23-29). Se dispone de tablas de uso de codones para una lista creciente de organismos (véase, por ejemplo, Wada *et al.*, 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118; Nakamura *et al.*, 2000, *Nucl. Acids Res.* 28:292; Duret, *et al.*, *supra*; Henaut y Danchin, "Escherichia coli and Salmonella", 1996, Neidhardt, *et al.* eds., ASM Press, Washington D.C., p. 2047-2066 La fuente de datos para obtener el uso de codones puede basarse en cualquier secuencia nucleotídica disponible capaz de codificar una proteína. Estos conjuntos de datos incluyen secuencias de ácidos nucleicos que de hecho se sabe codifican proteínas expresadas (por ejemplo, secuencias codificantes de proteínas completas-CDS), marcadores de secuencia expresada (ESTS), o regiones codificantes predichas de las secuencias genómicas (véase, 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 *et al.*, 1997, *Comput. Appl. Biosci.* 13:263-270).

"Secuencia de control" se refiere a todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido y/o polipéptido de interés. Cada secuencia de control puede ser original o extraña a un polinucleótido que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, una secuencia líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de terminación de la transcripción y de la traducción. Las secuencias de control pueden estar provistas de conectores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligación de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica un polipéptido.

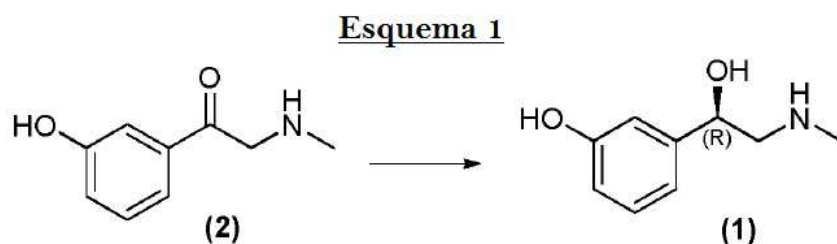
"Unido operativamente" se refiere a una configuración en la que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición con respecto a un polinucleótido (por ejemplo, en una relación funcional) de manera que la secuencia de control dirija o regule la expresión de un polinucleótido y/o polipéptido.

"Secuencia promotora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es reconocida por una célula hospedadora para la expresión de un polinucleótido de interés (por ejemplo, una región codificante). La secuencia de control puede comprender una secuencia promotora apropiada. La secuencia promotora contiene secuencias de control de la transcripción, que intervienen en la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que presente actividad transcripcional en la célula hospedadora de elección, incluidos promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede obtenerse a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares ya sea homólogos o heterólogos a la célula hospedadora.

B. Polipéptidos manipulados

La divulgación proporciona polipéptidos manipulados capaces de facilitar la interconversión de los alcoholes y cetonas con la reducción de un cofactor (por ejemplo, NAD⁺ a NADH o NADP⁺ a NADPH). En una forma de realización, la divulgación proporciona polipéptidos que catalizan de manera enantioespecífica la síntesis de fenilefrina a partir de un sustrato o producto intermedio apropiado.

Los polipéptidos manipulados estereoespecíficos que comprenden actividad cetorreductasa de la presente divulgación son capaces de convertir el sustrato 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona (compuesto (2)) en *R*-fenilefrina (compuesto (1)) (como se muestra en el Esquema 1) con una propiedad mejorada en comparación con la cetorreductasa natural, de tipo silvestre, de *L. kefir*, representada por la SEQ ID NO: 2.



Los polipéptidos de la divulgación se caracterizan por una propiedad mejorada en comparación con la cetorreductasa natural, de tipo silvestre, de *L. kefir*, representada por la SEQ ID NO: 2. Las propiedades enzimáticas para las que es deseable la mejora incluyen, pero no se limitan a, la actividad enzimática, la estabilidad térmica, el perfil de pH/estabilidad frente al pH, la refractariedad a inhibidores (por ejemplo, la retroinhibición), la estereoespecificidad, la pureza del producto, y la estabilidad frente a disolventes. Las mejoras en la enzima cetorreductasa pueden guardar relación con una única propiedad enzimática, tal como la estabilidad frente al pH/perfil de pH, o una combinación de diferentes propiedades enzimáticas, tal como la actividad enzimática y la estabilidad frente al pH.

En algunas formas de realización, la propiedad mejorada de los polipéptidos de la divulgación es con respecto a un aumento de la actividad enzimática en una condición de reacción de pH 6,75 a aproximadamente 7,0 a 30°C. En una forma de realización, la reacción se inicia a un pH de aproximadamente 7,0 y se reduce a un pH de aproximadamente 6,75 después de 2 horas. En una forma de realización adicional, el pH se mantiene a aproximadamente 6,75 de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas o hasta que la reacción está sustancialmente finalizada o se agota el sustrato. Las mejoras de la actividad enzimática pueden ser al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces mayores, o más, que la actividad cetorreductasa de una cetorreductasa de referencia, tal como el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o una cetorreductasa manipulada de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34 en la condición definida.

En algunas formas de realización, la propiedad mejorada del polipéptido cetorreductasa es con respecto a un aumento en la estabilidad frente al pH en condiciones definidas con relación a una cetorreductasa de referencia (por ejemplo, la SEQ ID NO: 4). En algunas formas de realización, la estabilidad frente al pH puede reflejarse en la actividad enzimática a un pH ácido (por ejemplo, aproximadamente pH 6,5-7,0), en las que las diferencias en la actividad enzimática pueden ser al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces mayores, o más, que la actividad mostrada por el polipéptido de la SEQ ID NO: 2, o una cetorreductasa manipulada de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34 en las mismas condiciones de pH ácido definidas.

En algunas formas de realización, la mejora de la actividad enzimática de los polipéptidos cetorreductasa de la divulgación puede ser un aumento de la tasa de conversión de un sustrato en producto, tal como la mejora de la conversión del compuesto (2) (1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona) en el compuesto (1) (*R*-fenilefrina) en una condición definida. En algunas formas de realización, la condición definida comprende 100 g/l de compuesto (2) en condiciones de reacción de pH de aproximadamente 6,5-7,0 y aproximadamente 30°C en un tiempo de reacción de aproximadamente 20-25 horas con aproximadamente 0,7 g/l-1,0 g/l de un polipéptido cetorreductasa de la divulgación.

En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa manipulados son capaces de una tasa de conversión para convertir el compuesto (2) en el compuesto (1) de al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, hasta el valor teórico del 100% de conversión del sustrato en el producto deseado en la condición definida.

En algunas formas de realización, la cetorreductasa mejorada es con respecto a la tasa de conversión en una condición de reacción alcalina definida. En algunas formas de realización, la condición de reacción comprende

- 100 g/l del sustrato de compuesto (2) en condiciones de reacción de pH de aproximadamente 7,0 reduciéndose a 6,75 durante aproximadamente 2 horas y una temperatura de aproximadamente 30°C en un tiempo de reacción de aproximadamente 20-25 horas (por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 horas) con aproximadamente 0,7 g/l a aproximadamente 1,0 g/l de un polipéptido cetorreductasa de la divulgación. En una forma de realización, la reacción se inicia a un pH de aproximadamente 7,0 y se reduce a un pH de aproximadamente 6,75 después de 2 horas. En una forma de realización adicional, el pH se mantiene a aproximadamente 6,75 de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas o hasta que la reacción está sustancialmente finalizada o se agota el sustrato.
- En algunas formas de realización, la propiedad mejorada del polipéptido cetorreductasa manipulado es con respecto a un aumento del exceso enantiomérico de la (*R*)-fenilefrina producida por el polipéptido. En algunas formas de realización, se produce un exceso enantiomérico de al menos un 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% ó 99,9%, o más, de la (*R*)-fenilefrina.
- En algunas formas de realización, una propiedad mejorada de la cetorreductasa manipulada es con respecto a una disminución de los productos de descomposición no enzimática formados en la conversión de un sustrato de compuesto (2) en un producto del compuesto (1) en comparación con la cantidad de producto de descomposición formado por una cetorreductasa de referencia, tal como el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 ó 4.
- En algunas formas de realización, la cantidad de producto de descomposición se reduce en al menos un 25% en comparación con la enzima de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 o de otra cetorreductasa manipulada, tal como la SEQ ID NO: 4. En algunas formas de realización, la cantidad de producto de descomposición se reduce en al menos un 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95%, o más, en comparación con la enzima de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 o de otra cetorreductasa manipulada, tal como la SEQ ID NO: 4.
- En algunas formas de realización, un polipéptido cetorreductasa manipulado de la divulgación puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, en comparación con una secuencia de referencia basada en la SEQ ID NO: 2 que tiene en el residuo correspondiente a I11, A64, T76, S96, V148 un aminoácido Z1; en el residuo correspondiente a V95, V99, E145, F147, T152, L153, Y190, D197 un aminoácido Z2; en el residuo correspondiente a A202 e Y249 un aminoácido Z4; en un residuo correspondiente a S159 un aminoácido Z5; en un residuo correspondiente a E200 un aminoácido Z7; y en un residuo correspondiente a M206 un aminoácido cisteína; y en las que los polipéptidos tienen actividad cetorreductasa.
- En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa mejorados del presente documento pueden comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, en comparación con una secuencia de referencia basada en la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34, en los que los residuos correspondientes a I11, A64, T76, V95, S96, V99, E145, A145, F147, L147, V148, T152, L153, S159, Y190, D197, E200, A202, M206, Y249 no están sustituidos y en los que el polipéptido tiene actividad cetorreductasa.
- En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa mejorados pueden tener diferencias de residuo en una o más posiciones de residuo en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 2 en las posiciones de residuo correspondientes a las siguientes: I11, A64, T76, V95, S96, V99, E145, F147, V148, T152, L153, S159, Y190, D197, E200, A202, M206, Y249. En algunas formas de realización, las diferencias de residuo comprenden en las posiciones correspondientes a I11, A64, T76, S96, V148 un aminoácido Z1; en el residuo correspondiente a V95, V99, E145, F147, T152, L153, Y190, D197 un aminoácido Z2; en el residuo correspondiente a A202 e Y249 un aminoácido Z4; en un residuo correspondiente a S159 un aminoácido Z5; en un residuo correspondiente a E200 un aminoácido Z7. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa pueden tener, además, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-14, 1-15, 1-16, 1-18, 1-20, 1-22, 1-24, 1-26, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 1-55 ó 1-60 diferencias de residuo en otras posiciones de residuo de aminoácido. En algunas formas de realización, el número de diferencias puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ó 60 diferencias de residuo en las otras posiciones de residuo de aminoácido. En algunas formas de realización, las diferencias de residuo en otras posiciones de residuo comprenden mutaciones conservadoras.
- En algunas formas de realización, el polipéptido cetorreductasa mejorado comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 2 y que tiene una(s) sustitución(es) de aminoácido(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en las posiciones correspondientes a: (i) I11 un aminoácido Z1; (ii) A64 un aminoácido Z1; (iii) T76 un aminoácido Z1; (iv) S96 un aminoácido Z1; (v) V148 un aminoácido Z1; (vi) V95 un aminoácido Z2; (vii) V99 un aminoácido Z2 (viii) E145 un aminoácido Z2 (ix) F147 un aminoácido Z2 (x) T152 un aminoácido Z2; (xi) L153 un aminoácido Z2; (xii) Y190 un aminoácido Z2; (xiii) D197 un aminoácido Z2; (xiv) A202 un aminoácido Z4 (xv) Y249 un aminoácido Z4; (xvi) S159 un aminoácido Z5; (xvii) E200 un aminoácido Z7; (xviii) M206 una cisteína; (xix) cualquier combinación de los anteriores; y (xx) 2 ó 3, 3 ó 4, 5 ó 6, 7 u 8, 9 ó 10, 11 ó 12, 13 ó 14, 14 ó 15, 16 ó 17, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-11, 2-12, 2-13, 2-14, 2-15, 2-16, 2-17 ó 2-18 combinaciones de cualquiera de las sustituciones anteriores. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa pueden tener, además, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-14, 1-15, 1-16, 1-18, 1-20, 1-22, 1-24, 1-26, 1-30, 1-35, 1-40, 1-

45, 1-50, 1-55 ó 1-60 diferencias de residuo en otras posiciones de residuo específicamente descritas anteriormente. En algunas formas de realización, el número de diferencias puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ó 60 diferencias de residuo en las otras posiciones de residuo. En algunas formas de realización, las diferencias de residuo en otras posiciones de residuo comprenden mutaciones conservadoras.

Las diferencias de residuo de aminoácido en otras posiciones de residuo en comparación con la secuencia de la cetorreductasa de *L. kefir* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 (nº de registro del GenBank AAP94029.1; GI:33112056) y el efecto de estas diferencias sobre la función de la enzima se proporcionan mediante, por ejemplo, los polipéptidos cetorreductasa manipulados de las siguientes publicaciones de patente, cada una de las cuales se incorpora de esta manera por referencia en el presente documento: publicaciones de patente de Estados Unidos nº 20080318295A1, 20090093031A1, 20090155863A1, 20090162909A1, 20090191605A1, 20100055751A1 y 20100062499A1; o publicaciones PCT nº WO/2010/025238A2 y WO/2010/025287A1. Por consiguiente, en algunas formas de realización, una o más de las diferencias de aminoácido proporcionadas en los polipéptidos cetorreductasa manipulados de estas publicaciones también podrían introducirse en un polipéptido cetorreductasa manipulado de la presente divulgación.

En algunas formas de realización, el polipéptido cetorreductasa manipulado puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% a una secuencia de aminoácidos de referencia basada en la SEQ ID NO: 2 que tiene las características descritas en el presente documento para los residuos correspondientes a T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, E145, F147, V148, T152, L153, S159, Y190, D197, E200, A202, M206, Y249 a condición de que los polipéptidos cetorreductasa manipulados tengan en los residuos correspondientes a T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, E145, F147, V148, T152, L153, S159, Y190, D197, E200, A202, M206, Y249 al menos las características anteriores (por ejemplo, combinación de diferencias de residuo que se encuentran en cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34).

En formas de realización específicas, las sustituciones en los residuos de la SEQ ID NO: 2 que corresponden a I11, A64, T76, V95, S96, V99, E145, F147, V148, T152, L153, S159, Y190, D197, E200, A202, M206, Y249 comprenden I11L, A64V, T76I, V95M, S96L, V99L, E145A, F147L, F147I, V148I, T152A, L153M, S159T, Y190C, Y190G, D197A, E200P, A202F, M206C e Y249F.

La Tabla 4, que se presenta más adelante, enumera los polipéptidos cetorreductasa manipulados (y los polinucleótidos codificantes) mediante el identificador de secuencia (SEQ ID NO) descrito en el presente documento junto con las diferencias de residuo específicas de los polipéptidos manipulados con respecto a la secuencia del polipéptido cetorreductasa de *L. kefir* de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) de la que se derivaron por evolución dirigida (véase, por ejemplo, Stemmer *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91:10747-10751). Cada fila de la Tabla 4 enumera dos SEQ ID NO, en las que el número impar se refiere a la secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido proporcionada por el número par.

Se determinó la actividad de cada polipéptido cetorreductasa manipulado con respecto al polipéptido manipulado SEQ ID NO: 4, que se utilizó como polipéptido "parental" o "esqueleto" para la evolución dirigida. Se determinó la mejora con respecto al parental ("FIOP") de la actividad como la conversión de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (*R*)-fenilefrina a pH 6,5 y temperatura ambiente durante 18-20 horas en presencia de NADP, como se describe en los Ejemplos que se presentan más adelante.

La actividad relativa del polipéptido de tipo silvestre ("WT") de la SEQ ID NO: 2 para la conversión de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (*R*)-fenilefrina a pH 6,5 y temperatura ambiente fue de aproximadamente un 7% a aproximadamente un 10% de la del polipéptido "esqueleto" manipulado de la SEQ ID NO: 4. En base a esta actividad relativa ~10 veces mayor de la SEQ ID NO: 4 en comparación con WT, se calcularon las actividades relativas en comparación con WT para los polipéptidos manipulados de las SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34, multiplicando por 10 el valor FIOP con respecto a la SEQ ID NO: 4. Estas actividades relativas se cuantificaron de la siguiente manera: "+" indica que la actividad de la cetorreductasa manipulada es de 10 veces a 75 veces mayor que la actividad del polipéptido de la (SEQ ID NO: 2) WT; "++" indica que la actividad de la cetorreductasa manipulada es de 75 veces a aproximadamente 750 veces mayor que la actividad de la (SEQ ID NO: 2) WT; y "+++" indica que la actividad de la cetorreductasa manipulada es de 750 veces a aproximadamente 1.600 veces mayor que la actividad de la WT (SEQ ID NO: 2).

Tabla 4: polipéptidos cetorreductasa, diferencias de residuo específicas, y actividades relativas para convertir el compuesto (2) en compuesto (1)

SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencia de residuo (con respecto a la SEQ ID NO: 2)	Nº de mutaciones codificantes en comparación con WT	FIOP (SEQ ID NO: 4)	Actividad relativa en comparación con WT
1/2	--	--	--	--
3/4	E145A, F147L, Y190C	3	1	+
5/6	V95M; E145A; F147L; Y190C; A202F; M206C	6	7,3	+
7/8	V95M; E145A; F147L; Y190G; A202F; M206C	6	14,6	++
9/10	V95M; S96L; E145A; F147L; Y190G; A202F; M206C; Y249F	8	29,2	++
11/12	T2S; T76I; V95M; S96L; E145A; F147L; V148I; Y190G; A202F; M206C; Y249F	11	46,7	++
13/14	T76I; V95M; S96L; E145A; F147L; V148I; T152A; L153M; Y190G; A202F; M206C; Y249F	12	74,75	++
15/16	A64V; T76I; V95M; S96L; V99L; E145A; F147L; V148I; T152A; L153M; S159T; Y190G; D197A; E200P; A202F; M206C; Y249F	17	112,1	+++
17/18	I11L; A64V; T76I; V95M; S96L; V99L; E145A; F147L; V148I; T152A; L153M; S159T; Y190G; D197A; E200P; A202F; M206C; Y249F	18	134,6	+++
19/20	I11L; A64V; T76I; V95M; S96L; V99L; E145A; F147L; V148I; T152A; L153M; S159T; Y190G; D197A; E200P; A202F; M206C; Y249F	18	161,5	+++
21/22	V95M; E145A; F147L; Y190C	4	1,4	+
23/24	E145A; F147L; Y190C; M206C	4	1,6	+
25/26	E145A; F147L; Y190C; A202F	4	2,9	+
27/28	V95M; E145A; F147L; Y190C; A202F	5	5,0	+
29/30	V95M; E145A; F147L; Y190C; A202F; M206C; Y249F	7	11,9	++
31/32	V95M; E145A; F147L; Y190G; A202F; M206C; Y249F	7	26,3	++
33/34	T2S; V95M; E145A; F147L; Y190G; A202F; M206C	7	19,0	++

En algunas formas de realización, el polipéptido cetorreductasa manipulado puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% a una secuencia de aminoácidos de referencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34 y en el que los aminoácidos en las posiciones de diferencias de residuo indicadas en la Tabla 4 (*supra*) no están cambiados y el polipéptido tiene actividad cetorreductasa. Por consiguiente, en algunas formas de realización, los polipéptidos manipulados son capaces de convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (R)-fenilefrina y comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 70% a la SEQ ID NO: 4 y comprenden adicionalmente la combinación de diferencias de residuo de cualquiera de las SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34, en comparación con la SEQ ID NO: 2.

En algunas formas de realización, estos polipéptidos manipulados pueden tener adicionalmente (es decir, además de las diferencias de residuo de las mutaciones mostradas en la Tabla 4) de aproximadamente 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-14, 1-15, 1-16, 1-18, 1-20, 1-22, 1-24, 1-26, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 1-55 ó 1-60 diferencias de residuo en comparación con la secuencia de referencia. En algunas formas de realización, el número de diferencias de residuo puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ó 60 diferencias en comparación con la secuencia de referencia. Las diferencias de residuo pueden comprender inserciones, deleciones o sustituciones, o combinaciones de las mismas. En algunas formas de realización, las diferencias de residuo comprenden sustituciones conservadoras en comparación con la secuencia de referencia.

En algunas formas de realización, un polipéptido cetorreductasa manipulado comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34.

En algunas formas de realización, el polipéptido cetorreductasa es capaz de convertir de manera estereoespecífica la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (*R*)-fenilefrina en condiciones de reacción de pH de aproximadamente 7,0 (reduciéndose a 6,75 durante aproximadamente 2 horas) y una temperatura de aproximadamente 30°C en un tiempo de reacción de aproximadamente 20-25 horas con aproximadamente 0,7 g/l a aproximadamente 1,0 g/l de un polipéptido cetorreductasa de la divulgación. En una forma de realización, la reacción se inicia a un pH de aproximadamente 7,0 y se reduce a un pH de aproximadamente 6,75 después de 2 horas. En una forma de realización adicional, el pH se mantiene a aproximadamente 6,75 de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas o hasta que la reacción está sustancialmente finalizada o se agota el sustrato. En algunas formas de realización, el polipéptido cetorreductasa capaz de convertir de manera estereoespecífica al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, de la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (*R*)-fenilefrina en condiciones de reacción de pH de aproximadamente 7,0 (reduciéndose hasta aproximadamente 6,75) y aproximadamente 30°C en aproximadamente 20-24 horas comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34.

En algunas formas de realización, una enzima cetorreductasa manipulada puede comprender delecciones de 1-20 aminoácidos por lo general en el extremo N-terminal o C-terminal. Por lo tanto, para todas y cada una de las formas de realización de los polipéptidos cetorreductasa de la divulgación, las delecciones pueden comprender 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, ó 20 o más aminoácidos, hasta un 10% del número total de aminoácidos, hasta un 20% del número total de aminoácidos, o hasta un 30% del número total de aminoácidos de los polipéptidos cetorreductasa, siempre que se mantenga la actividad funcional de la cetorreductasa. En algunas formas de realización, el número de delecciones puede ser 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-14, 1-15, 1-16, 1-18, 1-20, 1-22, 1-24, 1-26, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 1-55 ó 1-60 aminoácidos. En algunas formas de realización, el número de delecciones puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 29 ó 30 residuos de aminoácidos.

En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona un polipéptido manipulado capaz de convertir el compuesto (2) en compuesto (1) con una actividad al menos 1,2 veces, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 40 veces, al menos 60 veces mayor, o más, con respecto a la actividad del polipéptido de la SEQ ID NO: 2 ó 4, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% con un polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 2 ó 4, a condición de que se excluya la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de los polipéptidos cetorreductasa descritos en una cualquiera o más de las siguientes publicaciones de patente: publicaciones de patente de EE.UU. n° 20080318295A1, 20090093031A1, 20090155863A1, 20090162909A1, 20090191605A1, 20100055751A1 y 20100062499A1; o publicaciones PCT n° WO/2010/025238A2 y WO/2010/025287A1.

En algunas formas de realización, los polipéptidos descritos en el presente documento no están limitados a los aminoácidos codificados genéticamente y pueden estar compuestos, ya sea en su totalidad o en parte, por aminoácidos naturales y/o no codificados sintéticos. Determinados aminoácidos no codificados que se encuentran comúnmente de los que pueden estar compuestos los polipéptidos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: los D-estereoisómeros de los aminoácidos codificados genéticamente; ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr); ácido α -aminoisobutírico (Aib); ácido ϵ -aminohexanoico (Aha); ácido δ -aminovalérico (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-clorofenilalanina (Ocf); 3-clorofenilalanina (Mcf); 4-clorofenilalanina (Pcf); 2-fluorofenilalanina (Off); 3-fluorofenilalanina (Mff); 4-fluorofenilalanina (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-yodofenilalanina (Pif); 4-aminometilfenilalanina (Pamf); 2,4-diclorofenilalanina (Opef); 3,4-diclorofenilalanina (Mpfcf); 2,4-difluorofenilalanina (Opff); 3,4-difluorofenilalanina (Mpff); pirid-2-ilalanina (2pAla); pirid-3-ilalanina (3pAla); pirid-4-ilalanina (4pAla); naft-1-ilalanina (1nAla); naft-2-ilalanina (2nAla); tiazolilalanina (taAla); benzotienilalanina (bAla); tienilalanina (tAla); furilalanina (fAla); homofenilalanina (hPhe); homotirosina (hTyr); homotriptófano (hTrp); pentafluorofenilalanina (5ff); estirilalanina (sAla); autrilalanina (aAla); 3,3-difenilalanina (Dfa); ácido 3-amino-5-fenilpentanoico (Afp); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic); β -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 1-aminociclopent-(2 ó 3)-eno-4-carboxílico; ácido piperídico (PA); ácido azetidín-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 no codificados adicionales de los que pueden estar compuestos los polipéptidos descritos en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, los diversos aminoácidos proporcionados en Fasman, 1989, CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press, Boca Raton, FL, en las págs. 3-70 y las referencias citadas en el mismo, todas las cuales se incorporan por referencia). Estos aminoácidos pueden estar en la configuración L o D.

Los expertos en la materia reconocerán que los aminoácidos o residuos que portan grupos protectores de la cadena lateral pueden comprender también los polipéptidos descritos en el presente documento. Los ejemplos no limitativos de tales aminoácidos protegidos, que en este caso pertenecen a la categoría de aromáticos, incluyen (los grupos protectores enumerados entre paréntesis), pero no se limitan a: Arg(tos), Cys(metilbencilo), Cys(nitropiridinsulfenilo), Glu(δ -benciléster), Gln(xantilo), Asn(N- δ -xantilo), His(bom), His(bencilo), His(tos), Lys(Fmoc), Lys(tos), Ser(O-bencilo), Thr(O-bencilo) y Tyr(O-bencilo).

Los aminoácidos no codificantes que están conformacionalmente restringidos de los que pueden estar compuestos los polipéptidos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos N-metilo (configuración L); ácido 1-aminociclopent-(2 ó 3)-eno-4-carboxílico; ácido piperídico; ácido azetidina-3-carboxílico; homoprolina (hPro); y ácido 1-aminociclopentano-3-carboxílico.

C. Polinucleótidos que codifican los polipéptidos manipulados

En otra forma de realización, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican las enzimas cetorredutasa manipuladas. Los polinucleótidos pueden estar unidos operativamente a una o más secuencias de control heterólogas que regulan la expresión génica para crear un polinucleótido recombinante capaz de expresar el polipéptido. Pueden introducirse en células hospedadoras apropiadas constructos de expresión que contengan un polinucleótido heterólogo que codifica la cetorredutasa manipulada, para que expresen el polipéptido cetorredutasa correspondiente.

Debido al conocimiento sobre los codones correspondientes a los diversos aminoácidos, la disponibilidad de una secuencia de proteína proporciona una descripción de todos los polinucleótidos capaces de codificarla. La degeneración del código genético, en el que los mismos aminoácidos son codificados por codones alternativos o sinónimos, permite generar un número extremadamente grande de ácidos nucleicos, todos los cuales codifican las enzimas cetorredutasa descritas en el presente documento. Por lo tanto, después de haber identificado una secuencia de aminoácidos concreta, los expertos en la materia podrán generar multitud de diferentes ácidos nucleicos mediante una simple modificación de la secuencia de uno o más codones de manera que no cambie la secuencia de aminoácidos de la proteína. En este sentido, la divulgación contempla específicamente todas y cada una de las posibles variaciones de polinucleótidos que podrían generarse seleccionando combinaciones basadas en las posibles elecciones de codones, y todas estas variaciones deben considerarse descritas específicamente para cualquier polipéptido descrito en el presente documento, incluidas las secuencias de aminoácidos presentadas en la Tabla 2. En diversas formas de realización, los codones están seleccionados para adaptarse a la célula hospedadora en la que se produce la proteína. Por ejemplo, se utilizan los codones preferentes utilizados en las bacterias para expresar el gen en bacterias; se utilizan los codones preferentes utilizados en la levadura para la expresión en levadura; y se utilizan los codones preferentes utilizados en los mamíferos para la expresión en células de mamífero.

En algunas formas de realización, el polinucleótido comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido cetorredutasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99%, o más, con cualquiera de los polipéptidos cetorredutasa manipulados de referencia descritos en el presente documento, por ejemplo, cualquiera de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido cetorredutasa con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99%, o más, con una secuencia de aminoácidos de referencia basada en la SEQ ID NO: 2 que tienen modificaciones de aminoácidos en T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, E145, F147, V148, T152, L153, S159, Y190, D197, E200, A202, M206, Y249, tales como, por ejemplo, I11L, A64V, T76I, V95M, S96L, V99L, E145A, F147L, F147I, V148I, T152A, L153M, S159T, Y190C, Y190G, D197A, E200P, A202F, M206C e Y249F.

En algunas formas de realización, el polinucleótido codifica un polipéptido cetorredutasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, en comparación con una secuencia de referencia basada en la SEQ ID NO: 2 que tiene en el residuo correspondiente a I11, A64, T76, S96, V148 un aminoácido Z1; en el residuo correspondiente a V95, V99, E145, F147, T152, L153, Y190, D197 un aminoácido Z2; en el residuo correspondiente a A202 e Y249 un aminoácido Z4; en un residuo correspondiente a S159 un aminoácido Z5; en un residuo correspondiente a E200 un aminoácido Z7; y en un residuo correspondiente a la M206 un aminoácido cisteína; y en las que los polipéptidos tienen actividad cetorredutasa.

En algunas formas de realización, el polinucleótido codifica un polipéptido cetorreductasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, en comparación con una secuencia de referencia basada en la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34, en las que los residuos correspondientes a T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, A145, L147, V148, T152, L153, S159, C190, D197, E200, A202, M206, Y249 no están sustituidos y en las que el polipéptido tiene actividad cetorreductasa.

En algunas formas de realización, el polinucleótido codifica un polipéptido cetorreductasa que comprende diferencias de residuo en una o más posiciones de residuo en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 2 en las posiciones de residuo correspondientes a las siguientes: T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, E145, F147, V148, T152, L153, S159, Y190, D197, E200, A202, M206, Y249. En algunas formas de realización, las diferencias de residuo comprenden en las posiciones correspondientes a I11, A64, T76, S96, V148 un aminoácido Z1; en el residuo correspondiente a V95, V99, E145, F147, T152, L153, Y190, D197 un aminoácido Z2; en el residuo correspondiente a A202 e Y249 un aminoácido Z4; en un residuo correspondiente a S159 un aminoácido Z5; en un residuo correspondiente a E200 un aminoácido Z7. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa pueden tener, además, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-14, 1-15, 1-16, 1-18, 1-20, 1-22, 1-24, 1-26, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 1-55 ó 1-60 diferencias de residuo en otras posiciones de residuo de aminoácido. En algunas formas de realización, el número de diferencias puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ó 60 diferencias de residuo en las otras posiciones de residuo de aminoácido. En algunas formas de realización, las diferencias de residuo en otras posiciones de residuo comprenden mutaciones conservadoras.

En algunas formas de realización, el polinucleótido codifica un polipéptido cetorreductasa que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 2 y que tiene la(s) sustitución(es) de aminoácido(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en las posiciones correspondientes a: (i) I11 un aminoácido Z1; (ii) A64 un aminoácido Z1; (iii) T76 un aminoácido Z1; (iv) S96 un aminoácido Z1; (v) V148 un aminoácido Z1; (vi) V95 un aminoácido Z2; (vii) V99 un aminoácido Z2 (viii) E145 un aminoácido Z2 (ix) F147 un aminoácido Z2 (x) T152 un aminoácido Z2; (xi) L153 un aminoácido Z2; (xii) Y190 un aminoácido Z2; (xiii) D197 un aminoácido Z2; (xiv) A202 un aminoácido Z4 (xv) Y249 un aminoácido Z4; (xvi) S159 un aminoácido Z5; (xvii) E200 un aminoácido Z7; (xviii) M206 una cisteína; (xix) cualquier combinación de los anteriores; y (xx) 2 ó 3, 3 ó 4, 5 ó 6, 7 u 8, 9 ó 10, 11 ó 12, 13 ó 14, 14 ó 15, 16 ó 17, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-11, 2-12, 2-13, 2-14, 2-15, 2-16, 2-17 ó 2-18 combinaciones de cualquiera de las sustituciones anteriores. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa pueden tener, además, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-14, 1-15, 1-16, 1-18, 1-20, 1-22, 1-24, 1-26, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 1-55 ó 1-60 diferencias de residuo en otras posiciones de residuo específicamente descritas anteriormente. En algunas formas de realización, el número de diferencias puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ó 60 diferencias de residuo en las otras posiciones de residuo. En algunas formas de realización, las diferencias de residuo en otras posiciones de residuo comprenden mutaciones conservadoras.

En algunas formas de realización, el polipéptido cetorreductasa manipulado puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% a una secuencia de aminoácidos de referencia basada en la SEQ ID NO: 2 que tiene las características descritas en el presente documento para los residuos correspondientes a T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, E145, F147, V148, T152, L153, S159, Y190, D197, E200, A202, M206, Y249 a condición de que los polipéptidos cetorreductasa manipulados tengan en los residuos correspondientes a T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, E145, F147, V148, T152, L153, S159, Y190, D197, E200, A202, M206, Y249 al menos las características anteriores (por ejemplo, las combinación de diferencias de residuo que se encuentran en cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34).

En algunas formas de realización, el polinucleótido codifica un polipéptido cetorreductasa que comprende una secuencia como la presentada en la SEQ ID NO: 2, pero que tiene al menos una sustitución en un residuo correspondiente a T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, E145, F147, V148, T152, L153, S159, Y190, D197, E200, A202, M206 o Y249. En formas de realización específicas, las sustituciones comprenden T2S, I11L, A64V, T76I, V95M, S96L, V99L, E145A, F147L, F147I, V148I, T152A, L153M, S159T, Y190C, Y190G, D197A, E200P, A202F, M206C e Y249F.

En algunas formas de realización, los polinucleótidos codifican un polipéptido cetorreductasa manipulado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34.

En algunas formas de realización, los polinucleótidos que codifican las cetorreductasas manipuladas están seleccionados de entre las SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 ó 33. En algunas formas de realización, los polinucleótidos son capaces de hibridar en condiciones muy rigurosas con un polinucleótido que consiste en una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 ó 33, en las que el polinucleótido que hibrida en condiciones altamente rigurosas codifica una cetorreductasa funcional capaz de convertir el sustrato de fórmula estructural (I) en el producto de fórmula estructural (III).

En algunas formas de realización, los polinucleótidos codifican los polipéptidos descritos en el presente documento, pero tienen una identidad de secuencia de aproximadamente un 80%, o más, una identidad de secuencia de aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99%, o más, a nivel de nucleótidos con un polinucleótido de referencia que codifica la cetorreductasa manipulada. En algunas formas de realización, el polinucleótido de referencia está seleccionado de entre las secuencias polinucleotídicas representadas por las SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 ó 33.

Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido cetorreductasa mejorado puede manipularse de diversas maneras para que proporcione la expresión del polipéptido. En algunas formas de realización, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos cetorreductasa manipulados pueden proporcionarse como vectores de expresión en los que hay una o más secuencias de control para regular la expresión de los polinucleótidos. Las secuencias de control útiles con los polinucleótidos de la presente divulgación que incluyen, entre otros, promotores, secuencias líder, secuencias de poliadenilación, secuencias de propéptido, secuencias de péptido señal, y terminadores de la transcripción, son conocidas en la técnica de la recombinación y expresión de polinucleótidos. Puede ser deseable o necesario manipular el polinucleótido aislado antes de insertarlo en un vector dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar los polinucleótidos y secuencias de ácidos nucleicos utilizando métodos de ADN recombinante son conocidas en la técnica. Se proporciona orientación en Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; y Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel. F. ed., Greene Pub. Associates, 1998, actualizaciones hasta el 2006.

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido cetorreductasa manipulado, y una o más regiones de regulación de la expresión tales como un promotor y un terminador, un origen de replicación, etc., dependiendo del tipo de hospedador en el que se vayan a introducir. Las diversas secuencias de ácidos nucleicos y de control descritas anteriormente pueden juntarse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido en tales sitios. Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico de la presente divulgación puede expresarse insertando la secuencia de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se sitúa en el vector de manera que la secuencia codificante quede operativamente unida con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus), que pueda someterse de manera práctica a procedimientos de ADN recombinante y pueda dar lugar a la expresión de la secuencia polinucleotídica. La elección del vector dependerá por lo general de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que va a introducirse el vector. Los vectores pueden ser plásmidos circulares lineales o cerrados. Los vectores y las células hospedadoras adecuados para su uso con los polinucleótidos que codifican las cetorreductasas manipuladas de la presente divulgación son conocidos en la técnica.

En otra forma de realización, la divulgación proporciona una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido cetorreductasa mejorado, estando el polinucleótido unido operativamente a una o más secuencias de control para la expresión de la enzima cetorreductasa en la célula hospedadora. Las células para su uso en la expresión de los polipéptidos cetorreductasa codificados por los vectores de expresión de la divulgación son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Lactobacillus*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (nº de registro de la ATCC 201178)); células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como las células CHO, COS, BHK, 293, y de melanoma de Bowes; y células vegetales. Los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento apropiados para las células hospedadoras anteriormente descritas son conocidos en la técnica.

Los polinucleótidos para la expresión de una cetorreductasa pueden introducirse en las células mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Las técnicas incluyen, entre otras, electroporación, bombardeo de partículas de biobalística, transfección mediada por liposomas, transfección con cloruro cálcico, y fusión de protoplastos. Para el experto en la materia resultarán evidentes diversos métodos para introducir polinucleótidos en las células.

Una célula hospedadora ejemplar es *Escherichia coli* W3110. Puede crearse un vector de expresión uniendo operativamente un polinucleótido que codifica una cetorreductasa mejorada en el plásmido pCK11090 unido operativamente al promotor lac bajo el control del represor lacI. El vector de expresión también puede contener el origen de replicación P15a y el gen de resistencia a cloranfenicol. Las células que contienen el polinucleótido objeto en *Escherichia coli* W3110 pueden aislarse sometiendo las células a selección con cloranfenicol.

En algunas formas de realización, para generar los polipéptidos y polinucleótidos cetorreductasa mejorados de la divulgación, la enzima cetorreductasa de tipo silvestre o natural utilizada como secuencia de partida (o "parental") para la manipulación se obtiene (o deriva) de *L. kefir*. En algunas formas de realización, la secuencia polinucleotídica parental tiene optimización de codones para potenciar la expresión de la cetorreductasa en una célula hospedadora específica.

Como ilustración, se construye una secuencia polinucleotídica parental que codifica el polipéptido cetorreductasa de tipo silvestre de *L. kefir* a partir de oligonucleótidos preparados basándose en la secuencia de cetorreductasa disponible en la base de datos del GenBank (véase, nº de registro del GenBank AAP94029.1, GI:33112056, incorporado en el presente documento por referencia). La secuencia polinucleotídica parental puede tener optimización de codones para la expresión en *E. coli* y el polinucleótido con optimización de codones puede clonarse en un vector de expresión. Pueden identificarse los clones que expresan la cetorreductasa activa en *E. coli* y secuenciarse los genes para confirmar su identidad. A continuación, la secuencia polinucleotídica con optimización de codones puede utilizarse adicionalmente para diseñar una estabilidad, actividad deseada o una combinación de las mismas.

Las cetorreductasas manipuladas pueden obtenerse sometiendo el polinucleótido que codifica una cetorreductasa natural a mutagénesis y/o a métodos de evolución dirigida, como se analiza en el presente documento y se conoce en la técnica. Una técnica de evolución dirigida ejemplar útil para generar las cetorreductasas manipuladas de la divulgación es la mutagénesis y/o el barajado de ADN como se describe en Stemmer *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91:10747-10751; en los documentos WO 95/22625, WO 97/0078, WO 97/35966, WO 98/27230, WO 00/42651, WO 01/75767, y en la patente de EE.UU. nº 6.537.746, cada uno de los cuales se incorpora de esta manera por referencia en el presente documento. Otros procedimientos de evolución dirigida que pueden utilizarse incluyen, entre otros, el proceso de extensión escalonada (StEP), la recombinación *in vitro* (Zhao *et al.*, 1998, Nat. Biotechnol. 16:258-261), la PCR mutagénica (Caldwell *et al.*, 1994, PCR Methods Appl. 3:S136-S140), y la mutagénesis con casete (Black *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93:3525-3529).

Los clones obtenidos después de un tratamiento de mutagénesis se criban para seleccionar las cetorreductasas manipuladas que tienen una propiedad enzimática mejorada deseada. La medición de la actividad enzimática de las bibliotecas de expresión puede realizarse utilizando la técnica bioquímica convencional de supervisión de la velocidad de disminución del sustrato y/o aumento del producto. Cuando la propiedad enzimática mejorada deseada es la estabilidad térmica, la actividad enzimática puede medirse después de someter las preparaciones enzimáticas a una temperatura definida y midiendo la cantidad de actividad enzimática que queda después de los tratamientos térmicos. A continuación, se aíslan los clones que contienen un polinucleótido que codifica una cetorreductasa, se secuencian para identificar los cambios de secuencias nucleotídicas (de haberlos), y se utilizan para expresar la enzima en una célula hospedadora.

Cuando se conoce la secuencia del polipéptido manipulado, los polinucleótidos que codifican la enzima pueden prepararse mediante métodos convencionales de fase sólida, según los métodos de síntesis conocidos. En algunas formas de realización, pueden sintetizarse individualmente fragmentos de hasta aproximadamente 100 bases, a continuación, unirse (por ejemplo, mediante métodos de ligación enzimática o química, o métodos dependientes de polimerasa) para formar cualquier secuencia continua deseada. Por ejemplo, los polinucleótidos y oligonucleótidos de la invención pueden prepararse mediante síntesis química utilizando, por ejemplo, el clásico método de la fosforamidita descrito por Beaucage *et al.*, 1981, Tet. Lett. 22:1859-69, o el método descrito por Matthes *et al.*, 1984, EMBO J. 3:801-05, por ejemplo, como se practica por lo general en los métodos de síntesis automatizados. Según el método de la fosforamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se hibridan, se ligan y se clonan en vectores apropiados. Además, puede obtenerse esencialmente cualquier ácido nucleico a partir de cualquiera de diversas fuentes comerciales, tales como The Great American Gene Company, Ramona, CA, ExpressGen Inc. Chicago, IL, Operon Technologies Inc., Alameda, CA, y muchas otras.

En algunas formas de realización, la presente divulgación también proporciona métodos para preparar o fabricar los polipéptidos de origen no natural capaces de convertir el compuesto (2) en compuesto (1), en las que los métodos comprenden: (a) cultivar una célula hospedadora capaz de expresar un polinucleótido que codifica el polipéptido de origen no natural y (b) opcionalmente aislar el polipéptido a partir de la célula hospedadora. Los polipéptidos de origen no natural pueden expresarse en células apropiadas (como se ha descrito anteriormente), y aislarse (o recuperarse) a partir de las células hospedadoras y/o del medio de cultivo utilizando una cualquiera o más de las técnicas conocidas utilizadas para la purificación de proteínas, incluidas, entre otras, el tratamiento con lisozima, la sonicación, la filtración, la desestabilización salina, la ultracentrifugación y la cromatografía. Las técnicas cromatográficas para el aislamiento del polipéptido cetorreductasa incluyen, entre otras, la cromatografía de fase inversa, la cromatografía de líquidos de alto rendimiento, la cromatografía de intercambio iónico, la electroforesis en gel, y la cromatografía de afinidad.

En algunas formas de realización, el polipéptido de origen no natural de la divulgación puede prepararse y utilizarse de diversas formas aisladas, incluidas pero no limitadas a extractos brutos (por ejemplo, lisados sin células), polvos (, por ejemplo, polvos de matraz oscilante), liofilizados, y preparaciones sustancialmente puras (por ejemplo, polvos DSP), como se ilustra adicionalmente en los Ejemplos que se presentan más adelante.

En algunas formas de realización, el polipéptido de origen no natural de la divulgación puede prepararse y utilizarse en forma purificada. Generalmente, las condiciones para purificar una enzima particular dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, el peso molecular, la forma molecular, etc., y resultarán evidentes para los expertos en la materia. Para facilitar la purificación, se contempla que en algunas

formas de realización los polipéptidos cetorreductasa manipulados de la presente divulgación puedan expresarse como proteínas de fusión con marcadores de purificación, tales como colas de hexa-histidina con afinidad por los metales, o marcadores de anticuerpos para la unión a anticuerpos, por ejemplo, el epítipo de identificación myc.

Las enzimas cetorreductasa manipuladas expresadas en una célula hospedadora pueden recuperarse a partir de las células y/o del medio de cultivo utilizando una cualquiera o más de las técnicas conocidas para la purificación de proteínas, incluidas, entre otras, el tratamiento con lisozima, la sonicación, la filtración, la desestabilización salina, la ultracentrifugación y la cromatografía. Se dispone en el mercado de soluciones adecuadas para la lisis y la extracción de alta eficacia de las proteínas a partir de bacterias, tales como *E. coli*, con el nombre comercial CellLytic B™ de Sigma-Aldrich de St. Louis MO.

Las técnicas cromatográficas para el aislamiento del polipéptido cetorreductasa incluyen, entre otras, la cromatografía de fase inversa, la cromatografía de líquidos de alto rendimiento, la cromatografía de intercambio iónico, la electroforesis en gel, y la cromatografía de afinidad. Las condiciones para purificar una enzima particular dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, el peso molecular, la forma molecular, etc., y resultarán evidentes para los expertos en la materia.

En algunas formas de realización, pueden utilizarse técnicas de afinidad para purificar las enzimas cetorreductasa mejoradas. Para la purificación por cromatografía de afinidad, puede utilizarse cualquier anticuerpo que se una específicamente al polipéptido cetorreductasa. Para la producción de anticuerpos, puede inmunizarse a diversos animales hospedadores, incluidos pero no limitados a conejos, ratones, ratas, etc., inyectándoles un polipéptido cetorreductasa. El polipéptido puede estar fijado a un vehículo adecuado, tal como BSA, por medio de un grupo funcional de la cadena lateral o conectores fijados a un grupo funcional de la cadena lateral. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunitaria, dependiendo de la especie hospedadora, incluidos pero no limitados a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes para uso humano potencialmente útiles tales como BCG (bacilos Calmette Guérin) y *Corynebacterium parvum*.

D. Métodos de uso de los polipéptidos cetorreductasa manipulados

Los polipéptidos cetorreductasa manipulados descritos en el presente documento pueden utilizarse en procesos que comprenden la conversión de un compuesto sustrato (1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona) (por ejemplo, el compuesto (2) o el compuesto (2a)) en un compuesto producto (R)-fenilefrina (por ejemplo, el compuesto (1) o el compuesto (1a)), tal como se muestra en el **Esquema 1** o en el **Esquema 5** (que se presenta más adelante).

En algunas formas de realización, la divulgación proporciona procesos para preparar un compuesto producto (R)-fenilefrina que comprenden: poner en contacto un polipéptido manipulado de la presente divulgación (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente y en otras partes del presente documento) con una mezcla que comprende un sustrato 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona y un tampón, en condiciones de reacción adecuadas para convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (R)-fenilefrina.

Se contempla que pueda utilizarse en los métodos cualquiera de los polipéptidos manipulados con actividad cetorreductasa descritos en el presente documento. Por ejemplo, en algunas formas de realización, pueden llevarse a cabo los métodos en los que el polipéptido manipulado está seleccionado de una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, a la SEQ ID NO: 2, que comprende adicionalmente la combinación de diferencias de residuo de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34, en comparación con la SEQ ID NO: 2. En algunas formas de realización, puede utilizarse en los métodos uno cualquiera o más de los polipéptidos de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34.

En determinadas formas de realización, pueden llevarse a cabo los métodos para preparar un compuesto producto (R)-fenilefrina en los que el sustrato 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona está seleccionado de entre el compuesto (2) o el compuesto (2a) (es decir, la forma hidrosulfato del compuesto (2) que se muestra más adelante).

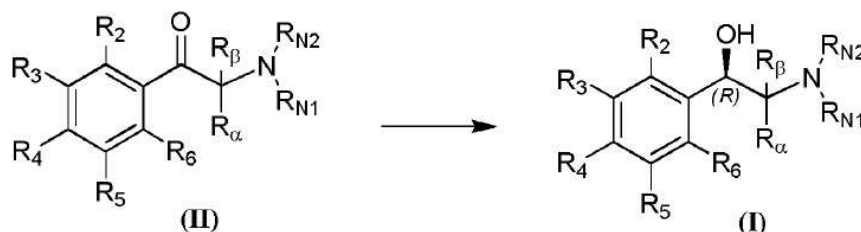
La presente divulgación contempla varias condiciones y etapas de reacción que pueden utilizarse en los métodos, incluidas pero no limitadas a intervalos de pH, temperatura, tampón, sistema de disolventes, carga de sustrato, carga de polipéptido, carga de cofactor NADP, atmósfera, tiempo de reacción, y otras condiciones de extracción y aislamiento del producto.

En determinadas formas de realización, pueden llevarse a cabo los métodos para preparar (R)-fenilefrina de la presente divulgación en los que las condiciones de reacción comprenden un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5 (por ejemplo, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0, o aproximadamente 7,0). En algunas formas de realización, puede llevarse a cabo el método en el que las condiciones de reacción comprenden un pH inicial de aproximadamente 7,0 y, a continuación, ajustar el pH inicial a aproximadamente 6,75 después de

- aproximadamente 2 horas. En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente, una vez finalizada la reacción enzimática, las etapas de saturar la mezcla con sal (por ejemplo, NaCl) y ajustar el pH entre 8,0 y 9,0, produciendo así una base libre del compuesto (1). En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente, una vez finalizada la reacción enzimática, la etapa de extraer la base libre del compuesto (1) con alcohol isopropílico (IPA). En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente, una vez finalizada la reacción enzimática, la etapa de acidificar (por ejemplo, con HCl) el extracto IPA de la mezcla y aislar la sal de (*R*)-fenilefrina (por ejemplo, sal de HCl del compuesto (1a) que se presenta más adelante).
- En algunas formas de realización, pueden llevarse a cabo los métodos para preparar (*R*)-fenilefrina de la presente divulgación en los que la mezcla comprende al menos aproximadamente 50 g/l-400 g/l de carga de sustrato 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona (por ejemplo, aproximadamente 50 g/l-100 g/l, aproximadamente 50 g/l-200 g/l, aproximadamente 50 g/l-300 g/l, aproximadamente 50 g/l-400 g/l, aproximadamente 100 g/l, aproximadamente 200 g/l, aproximadamente 300 g/l o aproximadamente 400 g/l). Los valores de las cargas de sustrato proporcionados en el presente documento se basan en el peso molecular de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona (es decir, el compuesto (2)) y contempla que también puedan utilizarse las cantidades molares equivalentes del hidrosulfato de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona (compuesto (2a)) (por ejemplo, 100 g/l de compuesto (2) equivalen a aproximadamente 130 g/l de compuesto (2a)).
- En algunas formas de realización, pueden llevarse a cabo los métodos para preparar (*R*)-fenilefrina de la presente divulgación en los que la concentración de polipéptido manipulado resultante en la mezcla es de aproximadamente 0,1 g/l-1,5 g/l, de aproximadamente 0,5 g/l-1,2 g/l, o de aproximadamente 0,7 g/l-1,0 g/l.
- En determinadas formas de realización, puede llevarse a cabo el método en el que las condiciones de reacción comprenden una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C. En determinadas formas de realización, la temperatura durante la reacción enzimática puede mantenerse a temperatura ambiente (por ejemplo, 25°C), 30°C, 35°C, 37°C, 40°C; o en algunas formas de realización puede ajustarse a lo largo de un perfil de temperatura durante la reacción.
- En determinadas formas de realización, puede llevarse a cabo el método en el que la mezcla comprende un disolvente que comprende un tampón y alcohol isopropílico al 50% (v/v). En algunas formas de realización, el tampón está seleccionado de entre trietanolamina (por ejemplo, TEA de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 0,2 M) y fosfato potásico (por ejemplo, fosfato de aproximadamente 0,025 M a aproximadamente 0,10 M). Como se muestra en los Ejemplos, el método puede llevarse a cabo utilizando tampón TEA 0,1 M (preparado a pH 6,0) o tampón fosfato potásico 0,05 M (preparado a pH 6,0) con buenos resultados. Sin embargo, el uso de tampón fosfato puede reducir las impurezas debido a la presencia de TEA.
- En determinadas formas de realización, puede llevarse a cabo el método en el que la mezcla comprende aproximadamente 0,03 g/l-0,1 g/l de NADP (por ejemplo, aproximadamente 0,05 g/l de NADP).
- En determinadas formas de realización, puede llevarse a cabo el método en el que las condiciones de reacción comprenden una atmósfera inerte (por ejemplo, N₂, Ar, etc.).
- Por consiguiente, en algunas formas de realización, los métodos para preparar (*R*)-fenilefrina de la presente divulgación pueden llevarse a cabo utilizando una combinación de cualquiera de las condiciones de mezcla y de reacción descritas anteriormente (y en otras partes del presente documento), por ejemplo, (1) un pH de aproximadamente 6,75-7,0; (2) una temperatura de aproximadamente 30°C; (3) alcohol isopropílico a aproximadamente el 50%; (4) aproximadamente 0,05 g/l de NADP; (5) aproximadamente 100 g/l de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona; (5) y aproximadamente 0,7 g/l-1,1 g/l del polipéptido; y (6) atmósfera de N₂.
- En algunas formas de realización, puede llevarse a cabo el método en el que las condiciones de reacción comprenden un pH de aproximadamente 6,75-7,0, una temperatura de aproximadamente 30°C, aproximadamente 100 g/l de compuesto (2) (ó 130 g/l del hidrosulfato del compuesto (2a)), y aproximadamente 1 g/l de un polipéptido que tiene una secuencia como la presentada en la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34 en un tiempo de reacción de aproximadamente 19-24 horas, en las que al menos el 50%-99% del sustrato se convierte en (*R*)-fenilefrina.
- En algunas formas de realización, la reacción enzimática del método puede llevarse entre 25°C y 40°C durante entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 24 horas, momento en el que aproximadamente del 50% al 99% del sustrato se convierte en producto (es decir, la reacción está sustancialmente finalizada o se ha agotado el sustrato).
- En algunas formas de realización, los métodos de la presente divulgación dan como resultado la producción del producto (*R*)-fenilefrina (por ejemplo, la reacción del Esquema 1 o del Esquema 5) en un exceso enantiomérico de al menos un 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% ó 99,9%.
- Los polipéptidos cetorreductasa manipulados descritos en el presente documento pueden catalizar la reducción estereoselectiva de varios sustratos cetónicos. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa

manipulados descritos en el presente documento, pueden utilizarse en un método para la conversión estereoselectiva de un compuesto sustrato de Fórmula II en un compuesto producto de Fórmula I como se muestra en el Esquema 2:

Esquema 2



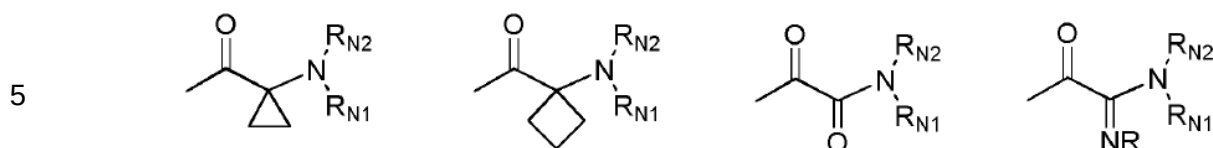
en las que R_2 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -NH₂, -NHCH₃, o un alquilo de cadena larga; R_3 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -S(O)CH₃, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -OR, -SR, -NR₂, -SO₂NR₂ (en los que R = -H, -CH₃, o alquilo), etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, o un alquilo de cadena larga; R_4 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -S(O)CH₃, -SO₂CH₃, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -SO₂NR₂ (en el que R = -H, -CH₃); R_5 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -S(O)CH₃, -SO₂CH₃, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -OR, -SR, -NR₂, -SO₂NR₂ (en los que R = -H, -CH₃, o alquilo), etilo, propilo, isopropilo o ciclopropilo; R_6 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -SH, o -NH₂; en las que R_2 y R_3 , R_3 y R_4 , o R_4 y R_5 pueden estar opcionalmente conectados como parte de un anillo de 5 ó 6 miembros; en las que R_α es un grupo seleccionado de entre: -H, -CH₃, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, o un alquilo de cadena larga; en las que R_β es un grupo seleccionado de entre: -H, -CH₃, etilo, propilo, isopropilo o ciclopropilo; en las que R_α y R_β pueden formar un anillo, o en las que la unidad R_α - R_β es un grupo funcional carbonilo o imino; en las que R_{N1} y R_{N2} pueden ser independientemente un grupo seleccionado de entre: -H, -CH₃, -OH, -OCH₃, -OR, -C(O)R (en los que R = -H, -CH₃, o alquilo), etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, alquilo de cadena larga, carbonilo, o carboxi.

El método para la reducción estereoselectiva de un sustrato de Fórmula II a un producto de Fórmula I comprende poner en contacto una mezcla que comprende el compuesto de Fórmula II con un polipéptido cetorreductasa manipulado de la presente divulgación en condiciones de reacción adecuadas para convertir el compuesto de Fórmula II en el compuesto Fórmula I. Los polipéptidos cetorreductasa manipulados adecuados útiles con el método comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% a una secuencia de aminoácidos de referencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34, en los que los aminoácidos en las posiciones de diferencias de residuo indicados en la Tabla 4 no están cambiados, y el polipéptido tiene actividad cetorreductasa.

En determinadas formas de realización del sustrato de Fórmula II, las posiciones R_2 y R_3 , R_3 y R_4 , o R_4 y R_5 pueden estar conectadas opcionalmente como parte de un anillo de 5 ó 6 miembros. Por ejemplo, como se muestra a continuación:



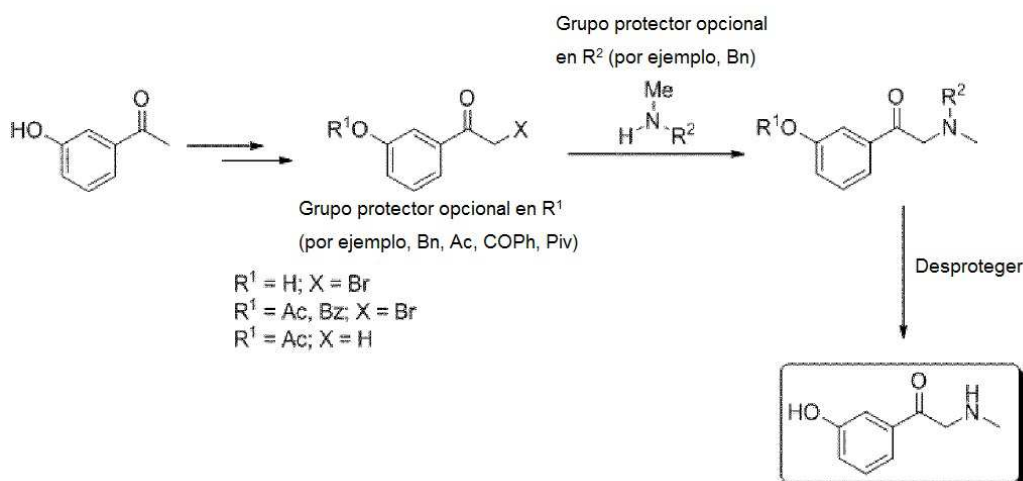
En determinadas formas de realización del sustrato de Fórmula II, el conector metileno puede estar sustituido con uno o dos grupos (R_α y R_β). R_α no está limitado y puede incluir un grupo que sobresale del bolsillo. R_β puede tener un tamaño de 2 ó 3 átomos pesados (cadena de alquilo pequeña, Me, Et, posiblemente 2-propilo). También podrían conectarse las dos posiciones en un anillo, un ejemplo de lo cual se proporciona a continuación, o tener la unidad R_α - R_β como una función carbonilo o imino (las dos estructuras de la derecha):



10 En determinadas formas de realización del sustrato de Fórmula II, el residuo amina está en el límite del bolsillo cuando se une a una cetorreductasa de la divulgación (esencialmente flotando en la solución). Por consiguiente, R_{N1} y R_{N2} pueden ser cualquier grupo tal como, pero sin limitarse a, alquilo, grupos carbonilo (para dar una amida), grupos carboxi (por ejemplo, un carbamato), o pueden modificarse para proporcionar una urea o guanidina. También podría conectarse el conector metileno al residuo amina para dar un anillo de 5 ó 6 miembros (por ejemplo, imidazol, tiazol, piridina y cualquier análogo saturado estable tal como oxazina).

15 Los compuestos sustrato de Fórmula II pueden prepararse mediante química convencional o adquirirse en el mercado. Por ejemplo, el sustrato de compuesto (2) se sintetiza como se expone en el Esquema 3.

Esquema 3



40 Por consiguiente, en un método para la síntesis de (*R*)-fenilefrina, una etapa del método comprende poner en contacto un polipéptido cetorreductasa manipulado de la presente divulgación con: (1) una mezcla que comprende un precursor de fenilefrina α -halo-cetona; o (2) una mezcla que comprende 1-(3-hidroxifenil)-2-metilaminoetanona.

45 En algunas formas de realización, las cetorreductasas manipuladas pueden utilizarse en un método para sintetizar análogos de fenilefrina.

En los siguientes ejemplos representativos se ilustran diversas características y formas de realización de la divulgación, que pretenden ser ilustrativos, y no limitativos.

50 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción de vectores de expresión para los polipéptidos cetorreductasa manipulados

55 Se diseñó el gen de la cetorreductasa de tipo silvestre de *L. kefir* (SEQ ID NO: 1) para la expresión en *E. coli* utilizando la optimización de codones convencional. (El software para la optimización de codones se revisa en, por ejemplo, "OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences", Puigbò *et al.*, Nucleic Acids Res., julio de 2007; 35 (publicación en el servidor Web): W126-31. Epub 2007 abril 16). Los genes se sintetizaron utilizando oligonucleótidos compuestos por 42 nucleótidos y se clonaron en el vector de expresión pCK110900 (vector representado como FIG. 3 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 20060195947, que se incorpora en el presente documento por referencia) bajo el control de un promotor *lac*. El vector de expresión también contenía el origen de replicación P15a y el gen de resistencia a cloranfenicol. Los plásmidos resultantes se transformaron en *E. coli* W3110 (*fhu*⁻) utilizando métodos convencionales. Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos cetorreductasa manipulados también se clonaron en el vector pCK1 10900 para la expresión en *E. coli* W3110 o *E. coli* BL21.

Se llevaron a cabo múltiples rondas de evolución dirigida del gen de *L. kefir* con optimización de codones utilizando el gen que codifica el polipéptido con la mayor mejora de cada ronda como secuencia "esqueleto" parental para la siguiente ronda de evolución. Se descubrió que un polipéptido que tenía una combinación de mutaciones E145A, F147L e Y190C (SEQ ID NO: 4) aumentaba la actividad al menos 10 veces en comparación con WT, y se utilizó esa variante como esqueleto para la siguiente ronda de evolución. Las secuencias del polipéptido cetorreductasa manipulado resultantes y las mutaciones específicas y actividades relativas se enumeran en la Tabla 4.

Ejemplo 2: Procedimiento del matraz oscilante para la producción de polvos de polipéptido cetorreductasa manipulado.

Se utiliza un procedimiento del matraz oscilante para generar polvos de polipéptido manipulado utilizados en los ensayos de actividad de alto rendimiento. Se inocula una sola colonia microbiana de *E. coli* que contiene un plásmido que codifica una cetorreductasa manipulada de interés, en 50 ml de caldo Luria Bertani que contiene 30 µg/ml de cloranfenicol y glucosa al 1%. Las células se cultivan durante la noche (al menos 16 horas) en una incubadora a 30°C con agitación a 250 rpm. El cultivo se diluye en 250 ml de Terrific Broth (12 g/l de bactotripton, 24 g/l de extracto de levadura, 4 ml/l de glicerol, fosfato potásico 65 mM, pH 7,0, MgSO₄ 1 mM) que contiene 30 µg/ml de cloranfenicol, en una matraz de 1 litro a una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,2 y se deja crecer a 30°C. La expresión del gen de la cetorreductasa se induce añadiendo isopropil-β-D-tiogalactósido ("IPTG") a una concentración final de 1 mM cuando la DO₆₀₀ del cultivo es de 0,6 a 0,8 y, a continuación, se sigue incubando durante la noche (al menos 16 horas).

Las células se recolectan por centrifugación (5.000 rpm, 15 minutos, 4°C) y se desecha el sobrenadante. El sedimento celular se resuspende con un volumen igual de tampón (cloruro de) trietanolamina 100 mM frío (4°C), pH 7,0 (que incluye opcionalmente MgSO₄ 2 mM), y se recolecta por centrifugación como anteriormente. Las células lavadas se resuspenden en dos volúmenes de tampón (cloruro de) trietanolamina frío y se hacen pasar dos veces por una prensa francesa a 12.000 psi mientras se mantienen a 4°C. Los restos celulares se eliminan por centrifugación (9.000 rpm, 45 minutos, 4°C). El sobrenadante del lisado transparente se recoge y se almacena a -20°C. La liofilización del lisado transparente congelado proporciona un polvo del matraz oscilante seco de polipéptido cetorreductasa bruto. Como alternativa, el sedimento celular (antes o después del lavado) puede almacenarse a 4°C o -80°C.

Ejemplo 3: Ensayo de actividad de alto rendimiento

Este ejemplo ilustra un ensayo espectrofotométrico de alto rendimiento llevado a cabo en un formato de placa de 96 pocillos que se utiliza como cribado de primera línea de la actividad relativa de los polipéptidos cetorreductasa manipulados (como en la Tabla 4), y para el seguimiento en tiempo real de bioprocesos que utilizan estos polipéptidos.

El sustrato (hidrosulfato del compuesto (2)) y NADP se disolvieron en tampón, seguido de adición de IPA y MgSO₄. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 6,5 con HCl o NaOH. A continuación, se añadió a la mezcla de reacción el lisado celular de una muestra de la evolución dirigida o una muestra del bioproceso que contenía el polipéptido cetorreductasa manipulado (5%-10% del volumen de reacción total) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18-20 horas. Las placas también contenían controles negativos (vector que contenía el gen de la beta-lactamasa), que deben incluirse en el ensayo para el cálculo de la conversión.

La reacción se diluyó con 4 volúmenes de mezcla MeCN/agua 1:1 y se mezcló bien para dar una dilución total de factor 5. La mezcla inactivada se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos. Se leyó previamente en el espectrofotómetro UV una placa vacía de 96 pocillos. A continuación, se añadió una muestra de la mezcla inactivada y se diluyó con agua para dar una dilución total de factor 5 (es decir, 40 µl de mezcla inactivada en 160 µl de agua). La placa se mezcló bien y, a continuación, se detectó la absorbancia a 300 nm utilizando el espectrofotómetro UV. Las condiciones de ensayo se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: condiciones de ensayo de la actividad HTP

Productos químicos/reactivos	Cantidad
Sustrato (1-(3-hidroxifenil)-2-metilaminoetanol sulfato)	10 g/l
NADP	0,1 g/l
Tampón (TEA.HCl 0,1 M, pH 6,5)	50% (v/v)
IPA	50% (v/v)
MgSO ₄	1 mM
Volumen de lisado celular	5%-10%
Volumen de reacción	200 µl
Temperatura de reacción	Ambiental
Tiempo de reacción	18 h - 20 h

El porcentaje de conversión del sustrato en el producto (*R*)-fenilefrina se calculó basándose en el valor del criterio de valoración obtenido del espectrofotómetro UV de la siguiente manera: porcentaje de conversión = (DO media del cont. neg. - DO de la muestra)/(DO media del cont. neg.) * 100%.

5 Ejemplo 4: Ensayos de HPLC de la actividad de la cetorreductasa manipulada

Este ejemplo ilustra cuatro métodos de HPLC que pueden utilizarse para supervisar y/o analizar los productos de las reacciones enzimáticas llevadas a cabo utilizando los polipéptidos cetorreductasa manipulados de la presente divulgación.

Se utilizó el Método 1 como método de alto rendimiento (HTP) para determinar el porcentaje de conversión del sustrato compuesto (2) en el producto (*R*)-fenilefrina del compuesto (1). El Método 2 era un método de gradiente para hacer seguimiento de las reacciones en química. El Método 3 era un método preciso para analizar la potencia (ensayo de % en peso) de la (*R*)-fenilefrina. El Método 4 determinaba la pureza enantiomérica de (*R*)-fenilefrina. La concentración de trabajo típica para cada uno de los métodos analíticos es 100 µg/ml-1.000 µg/ml, lo que asegura que los análisis se encuentran dentro del intervalo lineal del método.

a. Método 1: Método HTP

En las placas de 96 pocillos, se diluyó la mezcla de reacción con 4 volúmenes de mezcla MeCN/agua 1:1 y se mezcló bien para dar una dilución total de factor 5 (procedimiento de inactivación). La mezcla inactivada se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos, a continuación se añadieron las muestras y se diluyeron con fase móvil (NaOAc al 0,25%, pH 5,0) para dar una dilución total de factor 10 (es decir, 20 µl de mezcla inactivada en 180 µl de fase móvil). Las placas se mezclaron bien y, a continuación, se inyectaron en el HPLC. El equipo de cromatografía, las condiciones y los parámetros analíticos se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7: Condiciones cromatográficas

Instrumento	HPLC serie 1200 de Agilent
Columna	Mightysil Aqua RP18, 250 x 4,6 mm, 5 µm
Fase móvil	93% de (NaOAc al 0,25%; pH 5,0)/MeCN al 7%
Caudal	1,20 ml/min
Temperatura de la columna	40°C
Longitud de onda	275 nm
Volumen de inyección	10 µl
Tiempo de proceso	6 min
Tiempo de retención	Producto (3,3 min); sustrato (3,8 min)
Unidad	Parámetro analítico
Linealidad	R = 1,0 (sustrato); Intervalo lineal = 0 - 817 mg/l R = 0,99995 (producto); Intervalo lineal = 69,5 - 400 mg/l
LOD	0,51 mg/l (producto); 0,17 mg/l (sustrato)
LOQ	1,54 mg/l (producto); 0,43 mg/l (sustrato)

Un cromatograma ejemplar obtenido mediante este método en condiciones isocráticas presentó un pico de fenilefrina a los 3,224 minutos y un pico de sustrato ligeramente más ancho a los 3,701 minutos, que es aproximadamente dos tercios de la altura del pico de fenilefrina.

Utilizando la información cromatográfica obtenida mediante este método, puede calcularse el % de conversión de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Conversión} = \frac{(\text{Área de producto})}{[(\text{Área de producto}) + (\text{Área de sustrato} \times \text{Factor de respuesta})]} \times 100$$

El factor de respuesta se ensayó inyectando una mezcla 1:1 de solución de sustrato y producto a 0,5 mg/ml. A continuación, se calcula factor de respuesta como la siguiente ecuación:

$$\text{Factor de respuesta} = \frac{\text{Área del pico del producto}}{\text{Área del pico del sustrato}}$$

b. Método 2: Método del gradiente químico

Preparación de la muestra de HPLC: se recogieron 50 µl de mezcla de reacción y se disolvieron en 0,95 ml de una mezcla MeCN:agua (50:50). A continuación, la muestra se centrifugó para eliminar la enzima precipitada. Se recogieron 50 µl del sobrenadante y se disolvieron en 0,95 ml de fase móvil (NaOAc al 0,25%, pH 5,0), y se inyectaron en el HPLC. El equipo de cromatografía, las condiciones y los parámetros analíticos se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8: Condiciones cromatográficas

Instrumento	Varian 920-LC		
Columna	Mightysil RP18 GP, 250 x 4,6 mm, 5 µm (1 x columna de seguridad Aqua R18 antes de la columna analítica)		
Fase móvil (gradiente)	A: tampón ac.: NaOAc al 0,25%; pH 5,0 B: MeCN		
	Tiempo	% A	% B
	0	93	7
	10	93	7
	15	20	80
	25	20	80
	25,1	93	7
	30	93	7
Temperatura de la columna	Ambiental		
Caudal	1 ml/min		
Longitud de onda de detección	275 nm		
Volumen de inyección	10 µl		
Tiempo de proceso	25 min		
Tiempo de retención	fenilefrina: 5,4 min; sustrato: 6,4 min		

Un cromatograma típico obtenido a partir de este método utilizando 275 nm de detección presentó un pico de fenilefrina a los 5,4 minutos y un pico de sustrato a los 6,4 minutos, que era aproximadamente un cuarto de la altura del pico de fenilefrina. La LC/MS confirmó que no se encontró coelución en el pico de fenilefrina.

c. Método 3: Método de la potencia

Se pesó con precisión una muestra de producto (*R*)-fenilefrina (20 mg) en un matraz aforado de 100 ml, y se añadieron 20 ml de fase móvil. La mezcla se agitó durante 5 minutos, se sometió a ultrasonidos durante 10 minutos, y, a continuación, se completó hasta la marca de 100 ml añadiendo fase móvil. Después de hacerla pasar por una membrana de disco de 0,5 µm, se inyectó una muestra en el HPLC. El equipo de cromatografía, las condiciones y los parámetros analíticos se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9: Condiciones cromatográficas

Instrumento	HPLC serie 1200 de Agilent
Columna	Mightysil Aqua RP18, 250 x 4,6 mm, 5 µm
Fase móvil	98,5% de (NaOAc al 0,25%; pH 5,0)/MeCN al 5%
Caudal	1,0 ml/min
Temperatura de la columna	40°C
Longitud de onda de detección	275 nm
Volumen de inyección	10 µl
Tiempo de proceso	10 min
Tiempo de retención	Sustrato: 6,1 min.; fenilefrina: 7,5 min.
Unidad	Parámetro analítico
Especificidad/selectividad	No hay interferencia de disolventes ni tampones (IPA al 0,1%; MeCN al 5%; acetona al 0,1%; NaOAc al 0,25%) con el producto y el sustrato. Todos los picos de analitos son puros según el detector de matriz de diodos.
Idoneidad del sistema	% de RSD del área del pico: 1,84; % de RSD del tiempo de retención: 0,30 (la concentración de fenilefrina es 154 mg/l, n = 6)
Linealidad	R=0,99995 (producto) ; Intervalo lineal = 69,5 - 400 mg/l
LOD	0,51 mg/l, S/N>3
LOQ	1,54 mg/l, S/N>10 ; % de RSD del área = 2,69 (n=6)

Mediante este método puede calcularse el porcentaje de potencia de la siguiente manera:

$$\% \text{ de potencia} = \frac{\text{Área del pico de la muestra} \times \text{peso del pat.} \times \text{potencia del pat.}}{\text{Área del pico del pat.} \times \text{peso de la muestra}} \times 100$$

Un cromatograma obtenido utilizando este método presentó un pico de fenilefrina a aproximadamente los 6,05 minutos y un pico de sustrato a aproximadamente los 7,6 minutos, que era más ancho y aproximadamente 7 veces más alto que el pico de fenilefrina.

d. Método 4: Método quiral

Preparación de la muestra de HPLC: se recogieron 50 µl de la mezcla de reacción y se disolvieron en 0,95 ml de una mezcla MeCN/agua 50:50. A continuación, la muestra se centrifugó para eliminar la enzima precipitada. Se recogieron 50 µl del sobrenadante y se disolvieron en 0,95 ml de agua, y se inyectaron en el HPLC. Las etapas de preparación anteriores se basaron en 100 g/l de carga de sustrato. El equipo de cromatografía, las condiciones y los parámetros analíticos se resumen en la Tabla 10.

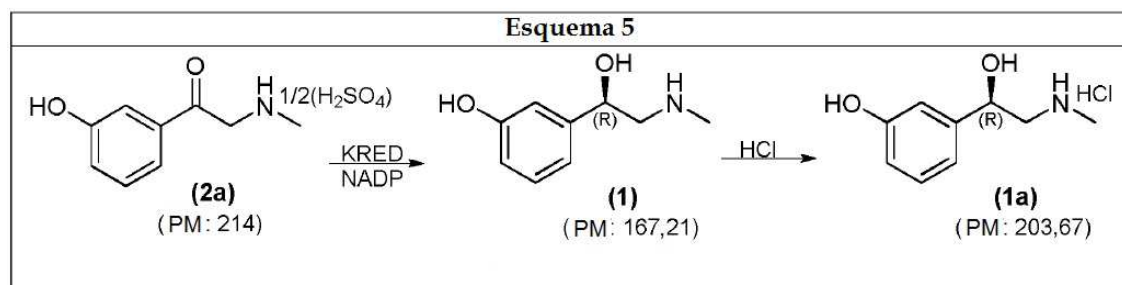
Tabla 10: Condiciones cromatográficas

Instrumento	HPLC serie 1200 de Agilent
Columna	Regis CBH 4,0 x 100 mm (5 µm)
Fase móvil	MeOH al 10% + 90% de (NH ₄ OAc 8 mM + EDTA 13 µM; pH 5,5)
Caudal	0,8 ml/min
Temperatura de la columna	Ambiental
Longitud de onda de detección	275 nm
Volumen de inyección	10 µl
Tiempo de proceso	5 min
Tiempo de retención	R (L): 2,6 min; S (D): 3,2 min
Unidad	Parámetro analítico
LOD	0,11 mg/L, S/N>3
LOQ	0,32 mg/L, S/N>10

Un cromatograma típico de este método presentó un pico a aproximadamente los 2,6 minutos y un pico ligeramente más corto y más ancho a aproximadamente los 3,3 minutos.

Ejemplo 5: Proceso para la síntesis enzimática de (R)-fenilefrina

Este ejemplo ilustra un proceso para preparar la sal de HCl de (R)-fenilefrina (compuesto **(1a)**) poniendo en contacto un sustrato de compuesto **(2a)** (la sal hidrosulfato del compuesto **(2)**) con un polipéptido cetorreductasa manipulado (KRED) de la divulgación (por ejemplo, los polipéptidos de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34) para formar el compuesto **(1)**, que a continuación se trata con HCl y se aísla. La sal hidrosulfato del sustrato era más estable a la descomposición que la base libre del sustrato en las condiciones del proceso. La reacción general para el proceso se representa a continuación en el Esquema 5.



Se añadió un total de 6,5 g de compuesto **(2a)** (la sal hidrosulfato del sustrato - que corresponde a 5,0 g de base libre del sustrato) en 44 ml de una solución acuosa de codisolvente de tampón TEA 0,1 M (pH 6,0) y alcohol isopropílico al 50% (IPA) a 30°C, contenida en un matraz de fondo redondo de 3 bocas. (Hubo poca diferencia entre las reacciones llevadas a cabo con tampón TEA 0,1 M y 0,2 M). Después de agitar 30 minutos, el pH inicial de 6,0 se ajustó a 7,0, y se añadieron a la solución de reacción 2,5 mg de NADP y 50 mg del polipéptido cetorreductasa de la SEQ ID NO: 20 (~ 1,0 g/l). El pH se mantuvo a pH 7,0 (o se redujo de pH 7,0 a pH 6,75 después de 2 horas).

Una vez finalizada la reacción enzimática (por ejemplo, a las 24 horas), la mezcla de reacción se filtró a través de Celite, se lavó con 25 ml de MTBE, y se saturó con NaCl. El pH se ajustó a 8,0-8,5 para producir la forma de base libre de (R)-fenilefrina (compuesto (1)) y se separó el IPA (capa orgánica) de la mezcla de reacción. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con 2 x 20 ml de IPA. Los extractos IPA combinados se concentraron hasta 0,25 del volumen a presión reducida. Después de acidificar los extractos IPA concentrados con HCl/IPA y dejar reposar a 5°C durante 24 horas, se aisló la sal de HCl de (R)-fenilefrina (compuesto (1a)) con un rendimiento de ~ 82%-92% con una pureza de ~ 94%-99% después de la filtración.

También se evaluaron los efectos del pH y la temperatura sobre el proceso enzimático, llevando a cabo las reacciones a pH 6,0-7,5 y a temperaturas de 25°C-40°C, manteniéndose constantes todos los demás parámetros. Cuando se llevó a cabo a pH 6,0, la reacción enzimática dio como resultado 1,3 veces menor conversión de sustrato en producto que las reacciones llevadas a cabo a pH 6,5. Las reacciones a 25°C con pH que variaba entre pH 6,75-7,25 presentaron unas tasas de conversión similares en el intervalo del 81%-85%. Sin embargo, la formación de productos de descomposición del sustrato aumentó significativamente a 25°C y a pH superior a 7,25, formándose ~ 3,5% y 8,5% de producto de descomposición después de 24 horas de reacción a pH 7,3 y 7,45, respectivamente (~ 20% del sustrato se descompone en ausencia de la enzima después de 24 horas a pH 7,0, IPA al 50%/tampón TEA). Las reacciones a 30°C presentaron > 99% de conversión de sustrato en producto fenilefrina a un pH de 6,75-7,0, pero las reacciones a 30°C y pH 7,25 dieron una conversión de sólo el 96%, sin que quedase sustrato a las 24 horas. Las reacciones en 35°C dieron como resultado ~ 4% de descomposición del sustrato a pH 6,75-7,0 sin que quedase sustrato a las 24 horas.

También puede utilizarse tampón fosfato en la reacción enzimática anterior a fin de reducir la contaminación del producto con trazas de trietanolamina. En lugar de 44 ml de tampón TEA 0,1 M (pH 6,0)/IPA al 50%, se utiliza la misma cantidad de 0,05 M de solución tampón fosfato potásico (pH 6,0)/IPA al 50% a 30°C, y se llevan a cabo los mismos ajustes de pH. También se utilizan las mismas etapas de extracción. La reacción tamponada con fosfato proporcionó > 98% de conversión después de 24 horas con solamente < 1,5% de descomposición del sustrato.

Las condiciones para el proceso del Ejemplo 5 se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones ejemplares del proceso enzimático

Carga de sustrato	100 g/l como base libre 130 g/l como sal hidrosulfato
Polipéptido KRED (por ejemplo, SEQ ID NO: 20)	1 g/l
NADP	0,05 g/l
Tampón/sistema de disolventes	TEA 0,1 M/IPA al 50% (pH 6,0) ○ fosfato 0,05 M/IPA al 50% (pH 6,0)
Perfil de pH	Partiendo de pH 6,0, ajustar a pH 7,0 (a continuación, añadir la enzima); mantener a pH 7,0 mientras dure la reacción. ○ Partiendo de pH 6,0, ajustar a pH 7,0 (a continuación, añadir la enzima); mantener a pH 7,0 durante 2 horas y dejar disminuir a 6,75, mantener a 6,75 hasta la finalización.
Temperatura de reacción	30°C

Ejemplo 6: Proceso para la síntesis enzimática de (R)-fenilefrina a escala de 50 g

Este ejemplo ilustra un proceso para preparar la sal HCl de (R)-fenilefrina a una escala de 50 g utilizando un polipéptido cetorreductasa manipulado (KRED) de la divulgación. La reacción general para el proceso fue como se representa en el Esquema 5 (*supra*). En general, la reacción se llevó a cabo como se describe para el Ejemplo 5 con las siguientes diferencias:

Se cargó la mezcla de reacción enzimática de 500 ml en un matraz de tres bocas e incluía: 100 g/l de sustrato 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona (~ 65 g de compuesto (2a)), 0,05 g/l de NADP, y 1,0 g/l de polipéptido de SEQ ID NO: 20, en tampón fosfato potásico 0,05 M (pH 6,0) con IPA al 50% (v/v).

El pH de la solución se ajustó a 7,0 y se mantuvo durante todo el procedimiento con un pH-stato. La temperatura se mantuvo a 30°C. Por lo demás, las condiciones fueron las mismas que en el Ejemplo 5. La reacción se dio por terminada (~ 99% de conversión) a las 22 horas.

Después de filtrar a través de Celite, la mezcla de reacción se concentró hasta ½ del volumen, se lavó con MTBE. La mezcla se llevó de nuevo hasta 500 ml con IPA y se saturó con NaCl. A continuación, el pH se ajustó a pH 8,0 a 8,5 y se dejó que la capa orgánica se separase y se eliminó. La capa acuosa restante se extrajo 2 veces con IPA y las capas orgánicas extraídas se combinaron y se concentraron adicionalmente. Después de la adición de MeOH, la

fase orgánica concentrada se filtró a través de Celite y, a continuación, se concentró adicionalmente. A continuación, este concentrado de fase orgánica final se acidificó con una solución de HCl/IPA y se dejó cristalizar.

Después de filtrar y secar los cristales, el proceso dio como resultado ~ 54 g de (R)-fenilefrina-HCl para un rendimiento global de aislamiento del 91%, con un 97,1%-98,8% de pureza.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Codexis, Inc.
 Alvizo, Oscar
 Collier, Steven
 Hennemann, Joerg
 Oh, Seong ho
 Zha, Wenjuan
 15 <120> Polipéptidos cetorreductasa para preparar fenilefrina
 <130> CX2-015WO1
 20 <150> 61/235.324
 <151> 19-08-2009
 <160> 34
 25 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 756
 <212> ADN
 30 <213> *Lactobacillus kefir*
 <400> 1
 35 atgactgac gtttaaaagg caaagtagca attgtaactg gcggtacctt gggaattggc 60
 ttggcaatcg ctgataagtt tgttgaagaa ggcgcaaagg ttgttattac cggccgtcac 120
 gctgatgtag gtgaaaaagc tgccaaatca atcggcggca cagacgttat ccgttttgct 180
 40 caacacgatg cttctgatga agccggctgg actaagttgt ttgatacgac tgaagaagca 240
 tttggcccg ttaccacggt tgtcaacaat gccggaattg cggtcagcaa gagtgttgaa 300
 gataccacaa ctgaagaatg gcgcaagctg ctctcagtta acttggatgg tgtcttcttc 360
 45 ggtacccgtc ttggaatcca acgtatgaag aataaaggac tcggagcatc aatcatcaat 420
 atgtcatcta tcgaagggtt tgttggatgat ccaactctgg gtgcatacaa cgcttcaaaa 480
 ggtgctgtca gaattatgtc taaatcagct gccttgatt gcgctttgaa ggactacgat 540
 50 gttcgggtta aactgttca tccaggttat atcaagacac cattgggtga cgatcttgaa 600
 ggggcagaag aaatgatgtc acagcggacc aagacaccaa tgggtcatat cggtgaacct 660
 aacgatatcg cttggatctg tgtttacctg gcatctgacg aatctaaatt tgccactggt 720
 gcagaattcg ttgtcgatgg tggatacact gctcaa 756
 55 <210> 2
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> *Lactobacillus kefir*
 60 <400> 2
 65 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala

ES 2 575 560 T3

	20	25	30
5	Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala 35 40 45		
	Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala 50 55 60		
10	Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala 65 70 75 80		
15	Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Val Ser 85 90 95		
	Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser 100 105 110		
20	Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg 115 120 125		
25	Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile 130 135 140		
	Glu Gly Phe Val Gly Asp Pro Thr Leu Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys 145 150 155 160		
30	Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu 165 170 175		
35	Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Tyr Ile Lys 180 185 190		
	Thr Pro Leu Val Asp Asp Leu Glu Gly Ala Glu Glu Met Met Ser Gln 195 200 205		
40	Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala 210 215 220		
45	Trp Ile Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly 225 230 235 240		
	Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln 245 250		
50	<210> 3		
	<211> 756		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> variante de cetorredutasa de <i>L. kefir</i>		
60	<400> 3		
65			

ES 2 575 560 T3

5
10
15
20
25

```

atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggactct gggatatcgggt    60
ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac    120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcgggca ctgatgttat tcgctttgtc    180
cagcacgatg catccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca    240
ttcggccccg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg cagtttccaa aagcgttgaa    300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc    360
ggcaccctgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat    420
atgagcagta ttgcggggct ggtaggcgat ccgacgctgg gggcatacaa cgcttccaag    480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat    540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggctgc atcaagacct cgctggctga tgatctggaa    600
ggtgctgagg aatgatgtc acagcgtacg aaaaccctta tgggccacat tggcgaaccg    660
aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt    720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtatacc gcacag                                756

```

30
35

<210> 4
<211> 252
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

<400> 4

40
45
50
55
60
65

```

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser

```

ES 2 575 560 T3

	100	105	110
5	Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg 115 120 125		
10	Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile 130 135 140		
15	Ala Gly Leu Val Gly Asp Pro Thr Leu Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys 145 150 155 160		
20	Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu 165 170 175		
25	Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Cys Ile Lys 180 185 190		
30	Thr Pro Leu Val Asp Asp Leu Glu Gly Ala Glu Glu Met Met Ser Gln 195 200 205		
35	Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala 210 215 220		
40	Trp Ile Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly 225 230 235 240		
45	Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln 245 250		

<210> 5

<211> 756

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de cetorredutasa de *L. kefir*

<400> 5

ES 2 575 560 T3

	atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggactct gggatcgggt	60
	ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac	120
5	gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
	cagcacgatg catccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
10	ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgagtaa aagcgttgaa	300
	gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc	360
	ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
15	atgagcagta ttgcggggct ggtaggcgat ccgacgctgg gggcatacaa cgcttccaag	480
	ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat	540
20	gtgcgtgtca acacagtaca tccgggctgc atcaagaccc cgctgggtcga tgatctggaa	600
	ggttttgagg aaatgtgttc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg	660
	aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcacttgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
25	gcagaatttg tggtcgacgg cgggtatacc gcacag	756

30	<210> 6 <211> 252 <212> PRT <213> Secuencia artificial
35	<220> <223> variante de cetorreductasa de <i>L. kefir</i>
	<400> 6

40

45

50

55

60

65

ES 2 575 560 T3

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

<210> 7

<211> 756
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

<400> 7

10	atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggactct gggatatcgg	60
	ttggcaatcg ccgataaatt thtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac	120
15	gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
	cagcacgatg catccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
	ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgagtaa aagcgttgaa	300
20	gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc	360
	ggcaccctgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
	atgagcagta ttgcggggct ggtaggcgat ccgacgctgg gggcatacaa cgcttccaag	480
25	ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat	540
	gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcggt atcaagacc cgtggtcga tgatctggaa	600
30	ggttttgagg aaatgtgttc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg	660
	aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcacttgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
	gcagaatttg tggtcgacgg cgggtatacc gcacag	756

35 <210> 8
<211> 252
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

<400> 8

45

50

55

60

65

ES 2 575 560 T3

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

<210> 9
 <211> 756
 <212> ADN

ES 2 575 560 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

5

<400> 9

10	atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggactct gggatatcgg	60
	ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac	120
	gcggatgtag gtgaaaaggg cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
15	cagcacgatg catccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
	ttcgccccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgctgaa aagcgttgaa	300
	gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc	360
20	ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
	atgagcagta ttgcggggct ggtaggcgat ccgacgctgg gggcatacaa cgcttccaag	480
	ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat	540
25	gtgctgtgca acacagtaca tccggggcgt atcaagacct cgctgggtcga tgatctggaa	600
	ggttttgagg aaatgtgttc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg	660
30	aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
	gcagaatttg tggtcgacgg cgggtttacc gcacag	756

<210> 10

<211> 252

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

<400> 10

45

50

55

60

65

ES 2 575 560 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

<400> 11

10	atgtcagatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacgct gggatatcgg	60
	ttggcaatcg ccgataaatt thtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac	120
	gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
15	cagcacgatg catccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacatcac cgaggaggca	240
	ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgctgaa aagcgttgaa	300
	gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc	360
20	ggcaccctgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
	atgagcagta ttgcggggct gatcggcgat ccgacgctgg gggcatacaa cgcttccaag	480
	ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat	540
25	gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcggt atcaagacct cgctggtcga tgatctggaa	600
	ggttttgagg aaatgtgttc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg	660
	aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
30	gcagaatttg tggtcgacgg cgggtttacc gcacag	756

<210> 12

<211> 252

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

<400> 12

45

50

55

60

65

ES 2 575 560 T3

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

60 <210> 13
 <211> 756
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> variante de cetorredutasa de *L. kefir*

ES 2 575 560 T3

<400> 13

5	atgactgatac gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacgct gggatcggt	60
	ttggcaatcg ccgataaatt tctagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgcgcac	120
	gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
10	cagcacgatg catccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacatcac cgaggaggca	240
	ttcgccccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgctgaa aagcgttgaa	300
	gacactacca cggaggaaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc	360
15	ggcaccgcgc tgggcattca gcgcataaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
	atgagcagta ttgcggggct gatcggcgat ccggcaatgg gggcatacaa cgcttccaag	480
20	ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat	540
	gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcggg atcaagacct cgctggctga tgatctggaa	600
	ggttttgagg aaatgtgttc acagcgtacg aaaaccctta tgggccacat tggcgaaccg	660
25	aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
	gcagaatttg tggcgcacgg cgggtttacc gcacag	756

30 <210> 14
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*
 <400> 14

40

45

50

55

60

65

ES 2 575 560 T3

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

ES 2 575 560 T3

<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

<400> 15

5	atgactgatac gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacgct gggatatcggt	60
	ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac	120
10	gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
	cagcacgatg tatccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacatcac cgaggaggca	240
	ttcggccccg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgctgaa aagccttgaa	300
15	gacactacca cggaggaaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc	360
	ggcaccctgc tgggcatcca gcgcataaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
	atgagcagta ttgcggggct gatcggcgat ccggcaatgg gggcatacaa cgctaccaag	480
20	ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat	540
	gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcggg atcaagaccc cgctggctgc agatctgccg	600
25	ggttttgagg aaatgtgttc acagcgtacg aaaaccctta tgggccacat tggcgaaccg	660
	aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
	gcagaatttg tggtcgacgg cgggtttacc gcacag	756

30

<210> 16

<211> 252

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

<400> 16

40

45

50

55

60

65

ES 2 575 560 T3

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

<210> 17
 <211> 756
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> variante de cetorredutasa de *L. kefir*

ES 2 575 560 T3

<400> 17

5	atgactgatc gtctgaaggg caaagtagcc ctggtaaccg gcgggacgct gggatatcgg	60
	ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac	120
	gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcgga ctgatgttat tcgctttgtc	180
10	cagcacgatg tatccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacatcac cgaggaggca	240
	ttcgccccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgctgaa aagccttgaa	300
15	gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc	360
	ggcaccctgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
	atgagcagta ttgcggggct gatcggcgat ccggcaatgg gggcatacaa cgctaccaag	480
20	ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat	540
	gtgcgtgtca acacagtaca tccggggcgt atcaagacct cgctggctgc agatctgccg	600
	ggttttgagg aaatgtgttc acagcgtagc aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg	660
25	aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
	gcagaatttg tggtcgacgg cgggtttacc gcacag	756

30

<210> 18

<211> 252

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> variante de cetorredutasa de *L. kefir*

40

<400> 18

45

50

55

60

65

ES 2 575 560 T3

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

<210> 19
 <211> 756
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> variante de cetorredutasa de *L. kefir*

ES 2 575 560 T3

<400> 19

5	atgactgatac gtctgaaggg caaagtagcc ctggtaaccg gcgggacgct gggatatcgg	60
	ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac	120
	gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcgcca ctgatgttat tcgctttgtc	180
10	cagcacgatg tatccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacatcac cgaggaggca	240
	ttcggccccg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgctgaa aagccttgaa	300
	gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgcta atctggatgg tgtttttttc	360
15	ggcaccgcgc tgggcattca gcgcataaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
	atgagcagta ttgcggggat catcggcgat ccggcaatgg gggcatacaa cgctaccaag	480
20	ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat	540
	gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcggg atcaagaccc cgctgggcgc agatctgccg	600
	ggttttgagg aaatgtgttc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg	660
25	aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
	gcagaatttg tggtcgacgg cgggtttacc gcacag	756

30 <210> 20
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*
 <400> 20

40

45

50

55

60

65

ES 2 575 560 T3

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

<210> 21
 <211> 756

ES 2 575 560 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

<400> 21

```

10      atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggactct gggatatcgg 60
      ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaa tagttattac tggtcgtcac 120
      gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
15      cagcacgatg catccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
      ttcggccccg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgagtaa aagcgttgaa 300
      gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360
20      ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
      atgagcagta ttgcggggct ggtaggcgat ccgacgctgg gggcatacaa cgcttccaag 480
      ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540
25      gtgcgtgtca acacagtaca tccgggctgc atcaagaccc cgctggctga tgatctggaa 600
      ggtgctgagg aaatgatgtc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg 660
30      aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
      gcagaatttg tggtcgacgg cgggtatacc gcacag 756

```

<210> 22

<211> 252

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

<400> 22

```

45      Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
      1          5          10          15
50      Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
      20          25          30
55      Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
      35          40          45

```

60

65

5 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
 10 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 15 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Met Ser
 85 90 95
 20 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 25 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 30 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 35 Ala Gly Leu Val Gly Asp Pro Thr Leu Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 40 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 45 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Cys Ile Lys
 180 185 190
 50 Thr Pro Leu Val Asp Asp Leu Glu Gly Ala Glu Glu Met Met Ser Gln
 195 200 205
 55 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 60 Trp Ile Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 65 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
 245 250

<210> 23

<211> 756

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de cetorredutasa de *L. kefir*

<400> 23

ES 2 575 560 T3

	atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggactct gggatatcgg	60
5	ttggcaatcg ccgataaatt thtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac	120
	gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
	cagcacgatg catccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
10	ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg cagtttcaa aagcgttgaa	300
	gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc	360
	ggcaccctgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
15	atgagcagta ttgcggggct ggtaggcgat ccgacgctgg gggcatacaa cgcttccaag	480
	ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat	540
20	gtgcgtgtca acacagtaca tccgggctgc atcaagacc cgtgggtcga tgatctggaa	600
	ggtgctgagg aaatgtgttc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg	660
	aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
25	gcagaatttg tggtcgacgg cgggtatacc gcacag	756
	<210> 24	
	<211> 252	
	<212> PRT	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> variante de cetorreductasa de <i>L. kefir</i>	
35	<400> 24	
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 575 560 T3

5	Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr	1 5 10 15
10	Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala	20 25 30
15	Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala	35 40 45
20	Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala	50 55 60
25	Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala	65 70 75 80
30	Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Val Ser	85 90 95
35	Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser	100 105 110
40	Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg	115 120 125
45	Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile	130 135 140
50	Ala Gly Leu Val Gly Asp Pro Thr Leu Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys	145 150 155 160
55	Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu	165 170 175
60	Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Cys Ile Lys	180 185 190
65	Thr Pro Leu Val Asp Asp Leu Glu Gly Ala Glu Glu Met Cys Ser Gln	195 200 205
	Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala	210 215 220
	Trp Ile Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly	225 230 235 240
	Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln	245 250
	<210> 25	
	<211> 756	

ES 2 575 560 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

<400> 25

10	atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggactct gggatatcgg	60
	ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac	120
	gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
15	cagcacgatg catccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
	ttcggccccg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg cagtttccaa aagcgttgaa	300
	gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc	360
20	ggcaccctgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
	atgagcagta ttgcggggct ggtaggcgat ccgacgctgg gggcatacaa cgcttccaag	480
25	ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat	540
	gtgcgtgtca acacagtaca tccgggctgc atcaagacc cgcgtggtcga tgatctggaa	600
	ggttttgagg aaatgatgtc acagcgtacg aaaaccctta tgggccacat tggcgaaccg	660
30	aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
	gcagaatttg tggtcgacgg cgggtatacc gcacag	756

35

<210> 26

<211> 252

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

<400> 26

45

50

55

60

65

ES 2 575 560 T3

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

ES 2 575 560 T3

<210> 27
 <211> 756
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

10

<400> 27

15

20

25

30

35

```

atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggactct gggatcgggt      60
ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac      120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcgcca ctgatgttat tcgctttgtc      180
cagcacgatg catccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcggccccg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgagtaa aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgta atctggatgg tgttttttc      360
ggcaccgcgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagta ttgcggggct ggtaggcgat ccgacgctgg gggcatacaa cgcttcgaag      480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat      540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggctgc atcaagaccc cgctggtcga tgatctggaa      600
ggttttgagg aaatgatgtc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcacttgacg aatcgaaatt tgcgacgggt      720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtatacc gcacag                                756
  
```

40

<210> 28
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

45

<400> 28

```

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

50

```

Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
  
```

55

60

65

ES 2 575 560 T3

	20	25	30
5	Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala 35 40 45		
10	Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala 50 55 60		
15	Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala 65 70 75 80		
	Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Met Ser 85 90 95		
20	Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser 100 105 110		
25	Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg 115 120 125		
30	Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile 130 135 140		
	Ala Gly Leu Val Gly Asp Pro Thr Leu Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys 145 150 155 160		
35	Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu 165 170 175		
40	Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Cys Ile Lys 180 185 190		
45	Thr Pro Leu Val Asp Asp Leu Glu Gly Phe Glu Glu Met Met Ser Gln 195 200 205		
	Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala 210 215 220		
50	Trp Ile Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly 225 230 235 240		
55	Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln 245 250		

60 <210> 29
<211> 756
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> variante de cetorredutasa de *L. kefir*

<400> 29

5	atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggactct gggatcgggt	60
	ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac	120
	gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
10	cagcacgatg catccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
	ttcggccccg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgagtaa aagcgttgaa	300
	gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc	360
15	ggcaccctgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
	atgagcagta ttgcggggct ggtaggcgat ccgacgctgg gggcatacaa cgcttccaag	480
	ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat	540
20	gtgcgtgtca acacagtaca tccgggctgc atcaagaccc cgctggtcga tgatctggaa	600
	ggttttgagg aaatgtgttc acagcgtagc aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg	660
	aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcactgtacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
25	gcagaatttg tggtcgacgg cgggtttacc gcacag	756

30
 <210> 30
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*
 <400> 30

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

ES 2 575 560 T3

	100	105	110
5	Val Asn Leu Asp Gly Val Phe	Phe Gly Thr Arg Leu Gly	Ile Gln Arg
	115	120	125
10	Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly	Ala Ser Ile Ile Asn Met	Ser Ser Ile
	130	135	140
15	Ala Gly Leu Val Gly Asp Pro Thr	Leu Gly Ala Tyr Asn Ala	Ser Lys
	145	150	155
20	Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys	Ser Ala Ala Leu Asp Cys	Ala Leu
	165	170	175
25	Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn	Thr Val His Pro Gly Cys	Ile Lys
	180	185	190
30	Thr Pro Leu Val Asp Asp Leu	Glu Gly Phe Glu Glu Met	Cys Ser Gln
	195	200	205
35	Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly	His Ile Gly Glu Pro Asn	Asp Ile Ala
	210	215	220
40	Trp Ile Cys Val Tyr Leu Ala	Ser Asp Glu Ser Lys Phe	Ala Thr Gly
	225	230	235
45	Ala Glu Phe Val Val Asp Gly	Gly Phe Thr Ala Gln	
	245	250	

<210> 31
 <211> 756
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> variante de cetorredutasa de *L. kefir*

<400> 31

ES 2 575 560 T3

	atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg ggggactct gggatatcgg	60
5	ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac	120
	gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
	cagcacgatg catccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
10	ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgagtaa aagcgttgaa	300
	gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc	360
	ggcaccctgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
15	atgagcagta ttgcggggct ggtaggcgat ccgacgctgg gggcatacaa cgcttccaag	480
	ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat	540
20	gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcggg atcaagacct cgctggtcga tgatctggaa	600
	ggttttgagg aaatgtgttc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg	660
	aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
25	gcagaatttg tggtcgacgg cgggtttacc gcacag	756

30	<210> 32 <211> 252 <212> PRT <213> Secuencia artificial
35	<220> <223> variante de cetorreductasa de <i>L. kefir</i>
	<400> 32

40

45

50

55

60

65

ES 2 575 560 T3

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

ES 2 575 560 T3

<210> 33
 <211> 756
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

10

<400> 33

15

20

25

30

35

```

atgtcagatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggactct gggtatcggg      60
ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac      120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc      180
cagcacgatg catccgatga ggcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg caatgagtaa aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc      360
ggcaccctgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagta ttgcggggct ggtaggcgat ccgacgctgg gggcatacaa cgcttccaag      480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat      540
gtgcgtgtca acacagtaca tccggggcgt atcaagacct cgctggtcga tgatctggaa      600
ggttttgagg aaatgtgttc acagcgtacg aaaaccctta tgggccacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcactctgac aatcgaaatt tgcgacgggt      720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtatacc gcacag                                756

```

<210> 34
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> variante de cetorreductasa de *L. kefir*

45

<400> 34

50

55

60

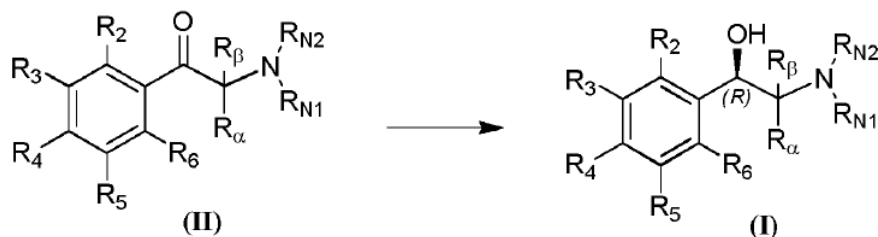
65

ES 2 575 560 T3

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

Reivindicaciones

- 5 1. Polipéptido manipulado capaz de convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (R)-fenilefrina, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido tiene una identidad de al menos un 70% con la SEQ ID NO: 4 y comprende la diferencia de residuo M206C.
- 10 2. Polipéptido manipulado según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos comprende adicionalmente al menos una diferencia de residuo en una posición de la SEQ ID NO: 4 correspondiente a T2, I11, A64, T76, V95, V99, V148, T152, L153, S159, D197 o E200, opcionalmente en el que la diferencia de residuo es V95M.
- 15 3. Polipéptido manipulado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la secuencia de aminoácidos comprende las diferencias de residuo: V95M, A202F y M206C, opcionalmente en el que la secuencia de aminoácidos comprende las diferencias de residuo: V95M, C190G, A202F y M206C, por ejemplo en el que la secuencia de aminoácidos comprende las diferencias de residuo: V95M, C190G, A202F, M206C e Y249F.
- 20 4. Polipéptido manipulado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de aminoácidos comprende la combinación de diferencias de residuo de cualquiera de las SEQ ID NO: 20, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34, en comparación con la SEQ ID NO: 2, opcionalmente en el que la secuencia de aminoácidos comprende la combinación de diferencias de residuo de la SEQ ID NO: 4, en comparación con la SEQ ID NO: 2.
- 25 5. Polipéptido manipulado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la secuencia de aminoácidos comprende adicionalmente al menos una de las siguientes diferencias de residuo:
 - I11, A64, T76 y/o V148 está sustituido con un aminoácido seleccionado de entre alanina (A), leucina (L), isoleucina (I), y valina (V);
 - V99, T152, L153 y/o D197 está sustituido con un aminoácido seleccionado de entre alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), glicina (G) o metionina (M);
 - 30 S159 está sustituido con un aminoácido seleccionado de entre asparagina (N), glutamina (Q), serina (S) o treonina (T); o
 - E200 está sustituido con un aminoácido seleccionado de entre prolina (P) o histidina (H).
- 35 6. Polipéptido manipulado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que:
 - (i) la secuencia de aminoácidos comprende al menos una diferencia de residuo seleccionada de entre T2S, I11L, A64V, T76I, V95M, S96L, V99L, V148L, T152A, L153M, S159T, D197A y E200P; y/o
 - (ii) la secuencia de aminoácidos comprende adicionalmente al menos 1-60 sustituciones conservadoras de aminoácidos en posiciones de la SEQ ID NO: 4 distintas de T2, I11, A64, T76, V95, S96, V99, A145, L147, V148, T152, L153, S159, C190, D197, E200, A202, M206 e Y249.
 - 40
- 45 7. Polipéptido manipulado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido manipulado es capaz de convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (R)-fenilefrina a pH 6,5 y 25°C con una actividad al menos 7,3 veces mayor que un polipéptido de la SEQ ID NO: 4.
- 50 8. Polipéptido manipulado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polipéptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 20, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34.
- 55 9. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, opcionalmente en el que la secuencia está seleccionada de entre la SEQ ID NO: 19, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 21, 23, 25, 27, 29, 31 y 33.
10. Vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 9 unido operativamente a una secuencia de control adecuada para dirigir la expresión en una célula hospedadora, opcionalmente en el que la secuencia de control comprende una señal de secreción.
- 60 11. Célula hospedadora que comprende el vector de expresión según la reivindicación 10, en la que opcionalmente la célula hospedadora es *E. coli*.
12. Método para preparar un polipéptido manipulado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende cultivar una célula hospedadora según la reivindicación 11 y opcionalmente aislar el polipéptido a partir de la célula.
- 65 13. Método para producir un compuesto de Fórmula I a partir de un compuesto de Fórmula II:



en las que R_2 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -NH₂, -NHCH₃, o un alquilo de cadena larga;

en las que R_3 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -S(O)CH₃, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -OR, -SR, -NR₂, -SO₂NR₂ (en los que R = -H, -CH₃, o alquilo), etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, o un alquilo de cadena larga;

en las que R_4 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -S(O)CH₃, -SO₂CH₃, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -SO₂NR₂ (en el que R = -H, -CH₃);

en las que R_5 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SH, -SCH₃, -S(O)CH₃, -SO₂CH₃, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -OR, -SR, -NR₂, -SO₂NR₂ (en los que R = -H, -CH₃, o alquilo), etilo, propilo, isopropilo o ciclopropilo;

en las que R_6 es un grupo seleccionado de entre: -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CH₃, -OH, -SH o -NH₂;

en las que R_2 y R_3 , R_3 y R_4 , o R_4 y R_5 pueden estar opcionalmente conectados como parte de un anillo de 5 ó 6 miembros;

en las que R_α es un grupo seleccionado de entre: -H, -CH₃, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, o un alquilo de cadena larga;

en las que R_β es un grupo seleccionado de entre: -H, -CH₃, etilo, propilo, isopropilo o ciclopropilo;

en las que R_α y R_β pueden formar un anillo, o en las que la unidad R_α - R_β es un grupo funcional carbonilo o imino;

en las que R_{N1} y R_{N2} pueden ser independientemente un grupo seleccionado de entre: -H, -CH₃, -OH, -OCH₃, -OR, -C(O)R (en los que R = -H, -CH₃, o alquilo), etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, alquilo de cadena larga, carbonilo, o carboxi;

comprendiendo el método poner en contacto una mezcla que comprende el compuesto de Fórmula II con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en condiciones de reacción adecuadas para convertir el compuesto de Fórmula II en el compuesto de Fórmula I.

14. Método según la reivindicación 13 para preparar (R)-fenilefrina, comprendiendo el método:

poner en contacto un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 con una mezcla que comprende un sustrato 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona y un tampón, en condiciones de reacción adecuadas para convertir la 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona en (R)-fenilefrina.

15. Método según la reivindicación 14, en el que:

(i) las condiciones de reacción comprenden una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 35°C;

(ii) las condiciones de reacción comprenden una temperatura de aproximadamente 30°C;

(iii) las condiciones de reacción comprenden un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0;

(iv) las condiciones de reacción comprenden un pH inicial de aproximadamente 7,0 y, a continuación, ajustar el pH inicial a aproximadamente 6,75 después de aproximadamente 2 horas;

(v) la mezcla contiene alcohol isopropílico al 50%;

(vi) el tampón está seleccionado de entre trietanolamina 0,1 M y fosfato potásico 0,05 M;

(vii) la mezcla comprende aproximadamente 0,05 g/l de NADP;

(viii) las condiciones de reacción comprenden una atmósfera inerte; y/o

(ix) las condiciones de reacción comprenden un pH de aproximadamente 6,75-7,0, una temperatura de aproximadamente 30°C, alcohol isopropílico a aproximadamente un 50%, aproximadamente 0,05 g/l de NADP, aproximadamente 100 g/l de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona, y aproximadamente 0,9-1,1 g/l del polipéptido, en el que la reacción se lleva a cabo en atmósfera de N₂ durante aproximadamente 19-24 horas.