

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 412**

51 Int. Cl.:

C07D 249/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2013 PCT/EP2013/066071**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO2014023623**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2013 E 13747999 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2882723**

54 Título: **Proceso para la producción de isavuconazol o ravuconazol**

30 Prioridad:

07.08.2012 EP 12179540

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

13.06.2017

73 Titular/es:

**BASILEA PHARMACEUTICA AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 487
4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**VAN SUMMEREN, RUBEN;
VAESSEN, HARRIE;
MINK, DANIEL y
WASER, MARIO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 616 412 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para la producción de isavuconazol o ravuconazol

La invención se refiere a un proceso para la producción de un intermedio de tipo éster diastereomérica o enantioméricamente enriquecido para isavuconazol o ravuconazol.

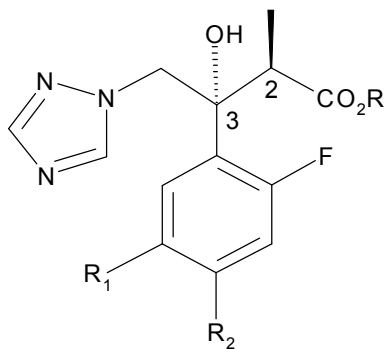
5 Isavuconazol y ravuconazol son compuestos antifúngicos triazólicos. En las patentes WO99/45008, WO2007/062542 y WO03/002498 de Basilea se divulgan procesos para la producción de isavuconazol y ravuconazol. En el documento WO2011/042827 se divulga un proceso para la producción de azoles antifúngicos enantioméricamente puros tales como ravuconazol e isavuconazol, donde se lleva a cabo una resolución clásica de una mezcla racémica mediante la adición de un ácido quiral enantiopuro, la recogida a continuación del diastereómero deseado y posteriormente la conversión de la sal en la forma enantioméricamente pura del compuesto deseado mediante el tratamiento con una base o una resina de intercambio iónico. Las desventajas de utilizar una resolución clásica de este tipo son que es necesario emplear el auxiliar quiral en cantidades prácticamente estequiométricas y que se requieren pasos del proceso adicionales para recuperar estas cantidades relativamente elevadas de reactivo quiral así como también para convertir la sal en el producto enatiopuro libre.

15 Por lo tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar un proceso mejorado para la producción de isavuconazol o ravuconazol con un exceso diastereomérico y enantiomérico elevado (e.d. y e.e. respectivamente).

La expresión "enantioméricamente enriquecido" tal y como se define en la presente es equivalente a la expresión "ópticamente activo" y se refiere a que uno de los enantiómeros de un compuesto está presente en exceso en comparación con el otro enantiómero. Este exceso se denominará en lo sucesivo en la presente "exceso enantiomérico" o e.e. (determinado, por ejemplo, por análisis por HPLC o GC quiral). El exceso enantiomérico e.e. es igual a la diferencia entre las cantidades de enantiómeros dividida por la suma de las cantidades de los enantiómeros, cuyo cociente se puede expresar como un porcentaje tras la multiplicación por 100.

La expresión "diastereoméricamente enriquecido" se refiere a que uno de los diastereómeros de un compuesto está presente en exceso en comparación con el otro diastereómero. Este exceso se denominará en lo sucesivo en la presente "exceso diastereomérico" o e.d. De manera similar, el exceso diastereomérico e.d. es igual a la diferencia entre las cantidades de diastereómeros dividida por la suma de las cantidades de los diastereómeros, cuyo cociente se puede expresar como un porcentaje tras la multiplicación por 100.

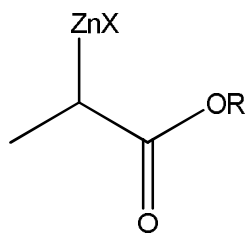
La invención se refiere ahora a un proceso para la manufactura de compuestos diastereoméricamente enriquecidos, de acuerdo con la fórmula (I),



donde R_1 y R_2 son cada uno flúor o hidrógeno y cuando R_1 es flúor, R_2 es hidrógeno y cuando R_2 es flúor, R_1 es hidrógeno, donde R es un alquilo C_1 - C_{12} , un arilo C_5 - C_{12} o un aralquilo C_6 - C_{11} ,

que comprende los siguientes pasos:

(i) preparación de un éster 2-halozincpropiionato de acuerdo con la fórmula (II)

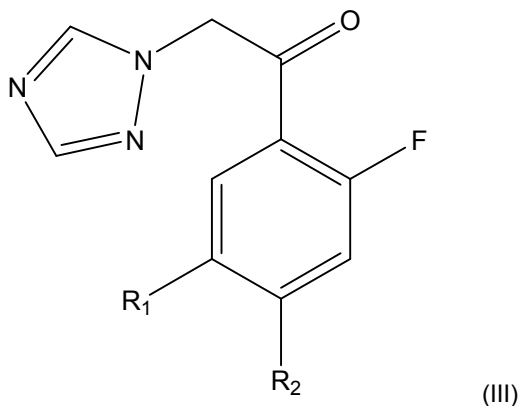


donde X es bromo, yodo o cloro,

en presencia de un disolvente,

a una temperatura por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente,

(ii) introducción de una cetona de acuerdo con la fórmula (III)



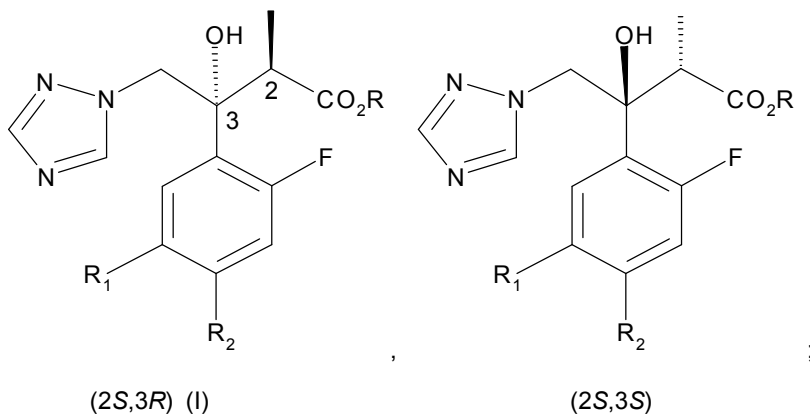
5 (iii) una reacción de Reformatsky entre el éster 2-halozincproionato de acuerdo con la fórmula (II) y la cetona de acuerdo con la fórmula (III) en presencia de un disolvente,

eliminación del exceso de zinc,

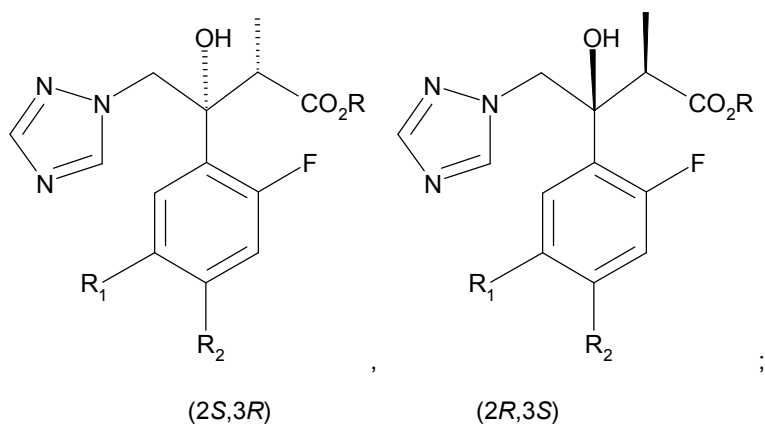
que da como resultado un precipitado de los diastereómeros deseados (2*R*,3*R*)/(2*S*,3*S*) de los ésteres de acuerdo con la fórmula (I),

10 donde la secuencia en la que se llevan a cabo los pasos (i) y (ii) se puede intercambiar.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de una mezcla de diastereómeros de un derivado de tipo éster del ácido 3-hidroxi-2-metil-4-[1,2,4]triazol-1-il-3-fenilbutírico de acuerdo con la fórmula (I):



15

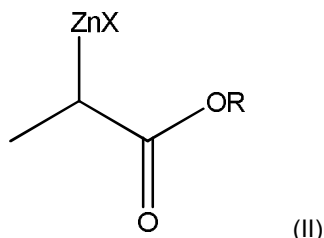


que está enriquecida en el racemato (2*R*,3*R*)/(2*S*,3*S*) correspondiente, y

donde R₁ y R₂ son cada uno flúor o hidrógeno y cuando R₁ es flúor, R₂ es hidrógeno y cuando R₂ es flúor, R₁ es hidrógeno, donde R es un alquilo C₁-C₁₂, un arilo C₅-C₁₂ o un aralquilo C₆-C₁₁,

que comprende los siguientes pasos:

- 5 (i) preparación de un éster 2-halozincpropionato de acuerdo con la fórmula (II)

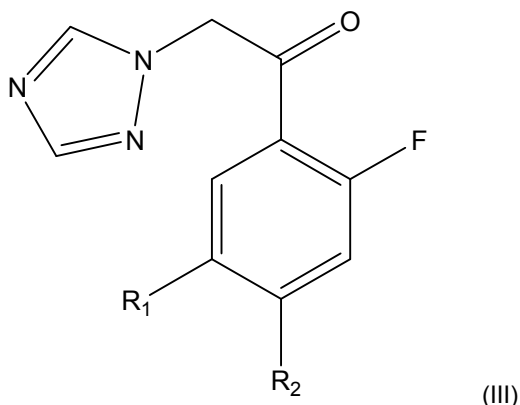


donde X es bromo, yodo o cloro,

en presencia de un disolvente,

a una temperatura por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente,

- 10 (ii) introducción de una cetona de acuerdo con la fórmula (III)



(iii) llevar a cabo una reacción de Reformatsky entre el éster 2-halozincpropionato de acuerdo con la fórmula (II) y la cetona de acuerdo con la fórmula (III),

en presencia de un disolvente,

- 15 permitir que la mezcla de reacción resultante forme un precipitado dejando la mezcla, con o sin agitación, durante más de 0.5 horas, preferentemente durante más de 2 horas, después de la adición del último reactivo a la mezcla, donde el precipitado está enriquecido en el (2*R*,3*R*)/(2*S*,3*S*)-éster racémico de acuerdo con la fórmula (I), y

separar dicho precipitado,

- 20 donde la secuencia en la que se llevan a cabo los pasos (i) y (ii) se puede intercambiar y donde el exceso de zinc se elimina antes de la formación de dicha precipitación.

Sorprendentemente, esta reacción de tipo Reformatsky conduce a isavuconazol y ravuconazol diastereoméricamente enriquecidos. En comparación con los métodos de la técnica anterior, el proceso de acuerdo con la invención requiere reactivos y condiciones simples y suministra el isómero deseado con un rendimiento elevado.

- 25 En el documento EP0199474 se empleó la reacción de Reformatsky para la producción de compuestos triazólicos. Se ha divulgado que estos compuestos se pueden obtener en forma de mezclas racémicas y que estas mezclas se pueden separar en los isómeros individuales mediante métodos conocidos en la técnica. Sin embargo, la resolución enzimática eficaz del éster racémico obtenido con la reacción de Reformatsky requiere que el éster se pueda escalar y producir de manera rentable con una pureza diastereomérica elevada. Los ésteres obtenidos a partir de las reacciones de Reformatsky, tal y como se divulgan en el documento EP0199474 no cumplen este requisito, como se
- 30 ha demostrado en el ejemplo comparativo B de esta solicitud. Sorprendentemente, los inventores han observado que

la utilización de una reacción de Reformatsky cuando el reactivo de Reformatsky que es un éster 2-halozincpropionato se obtiene a una temperatura por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente y a continuación se permite la precipitación de acuerdo con la presente invención proporciona un acceso directo al diastereómero deseado del éster (I) con un e.d. muy elevado (> 97%) en un único paso.

- 5 Un método alternativo para la preparación del éster (I) racémico es una reacción de acoplamiento utilizando una sal de litio orgánica. Por ejemplo, el documento WO9217474 divulga un método para preparar un éster (I) (R_2 es F) a través de un acoplamiento mediado por diisopropilamida de litio (LDA) de etilpropionato y una cetona (III) (R_2 es F) a -70 °C. Se empleó cromatografía en columna para separar los dos diastereómeros que se forman en la reacción (no se menciona el e.d.), que, a gran escala, se considera un método de purificación ineficaz y caro. Los propios
10 investigadores obtuvieron resultados similares (remítase al ejemplo comparativo A): cuando se acopló propionato de etilo con la cetona (III) (R_1 es F) en presencia de LDA a -78 °C, se aisló el éster (I) deseado (R_1 es F) con un 61% de rendimiento con un exceso diastereomérico (d.e.) deficiente de un 29%. Por lo tanto, considerando

a) las diastereoselectividades deficientes y los bajos rendimientos concomitantes de la reacción;

b) la ausencia de un método escalable y rentable para incrementar el e.d. tras la reacción y

- 15 c) la utilización de condiciones anhidras a baja temperatura que se asocian con costos elevados,

las reacciones de acoplamiento en las que intervienen bases fuertes como LDA (LiHMDS, etc.) no proporcionan una ruta industrialmente relevante para obtener los ésteres de la estructura general (I).

- 20 El exceso diastereomérico medido tras la reacción de Reformatsky del proceso de acuerdo con la invención varía entre un 50 y un 60% de e.d. Después de la precipitación, el producto se aísla con excesos diastereoméricos que están comprendidos entre un 97% y un 99.9% de e.d.

El producto obtenido tras el paso (iii) del proceso de acuerdo con la invención se puede resolver de acuerdo con cualquier método conocido incluida, p. ej., la cristalización diastereomérica de la mezcla de ésteres tras la saponificación del éster y la reacción de la mezcla de ácidos obtenida con una base ópticamente pura como la 1-feniletilamina o el 2-amino-1-butanol, o HPLC quiral.

- 25 Sin embargo, se prefiere la resolución enzimática posterior del éster ($2R,3R$)/($2S,3S$) (I) con una enzima esterasa porque conduce a una ruta industrialmente escalable atractiva de isavuconazol o ravuconazol con e.d. de más de un 99% y e.e. de más de un 99%. Nunca se ha publicado una estrategia de resolución enzimática de este tipo para (intermedios de) agentes antifúngicos basados en triazoles a pesar de que esta clase de compuestos ha sido el centro de atención de la industria farmacéutica durante más de 3 décadas y a pesar de que la resolución enzimática es una tecnología que, por lo demás, se emplea frecuentemente en los procesos farmacéuticos. Asimismo, una
30 solicitud de patente muy reciente en este campo (WO2011/042827), que tiene el paso de resolución como el principal objeto de la invención, divulga únicamente resoluciones clásicas y no una resolución enzimática. Posiblemente, las propiedades estéricas relativamente exigentes de los agentes antifúngicos basados en triazoles los convierten en sustratos que constituyen un desafío mayor para las enzimas en general. Claramente, no es sencillo encontrar una enzima adecuada para este tipo de sustrato. De hecho, se cribaron más de 200 enzimas
35 hidrolíticas para el proceso de acuerdo con la invención y únicamente un tipo de familia enzimática (a saber, las esterases) proporcionó tanto actividad como selectividad respecto a los ésteres de fórmula general (I).

- Resumiendo, la preparación industrial de los agentes antifúngicos isavuconazol y ravuconazol requiere métodos escalables y eficaces para la introducción tanto de diastereoselectividad como de enantioselectividad. El protocolo
40 de precipitación de Reformatsky diastereoselectivo publicado en la presente junto con el procedimiento de resolución enzimática proporciona ambas.

- En una realización preferida de la presente invención, la fórmula (I) representa el intermedio de tipo éster para isavuconazol. Cuando R_1 es flúor y R_2 es hidrógeno en la fórmula (I), se representa el intermedio de tipo éster para isavuconazol. Cuando R_1 es hidrógeno y R_2 es flúor en la fórmula (I), se representa el intermedio de tipo éster para
45 ravuconazol.

- R en el éster 2-halozincpropionato de acuerdo con la fórmula (II) puede ser un alquilo C_1 - C_{12} ramificado o no ramificado, un arilo C_5 - C_{12} o un aralquilo C_6 - C_{11} , preferentemente un alquilo C_1 - C_8 ramificado o no ramificado o un arilo C_5 - C_8 , más preferentemente un alquilo C_1 - C_4 ramificado o no ramificado. Un alquilo C_1 - C_4 ramificado o no ramificado puede ser cualquiera de los siguientes: metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo. Un
50 ejemplo del éster 2-halozincpropionato de arilo es el éster 2-halozincpropionato de fenilo. Preferentemente, R es metilo o etilo, más preferentemente R es etilo.

X en el éster 2-halozincpropionato de acuerdo con la fórmula (II) puede ser cualquiera de los siguientes: bromo, yodo o cloro. Más preferentemente, X es bromo.

En una realización de la presente invención, R en la fórmula (II) es etilo y X en la fórmula (II) es bromo.

La temperatura que se emplea en la reacción de Reformatsky de acuerdo con la invención y, más específicamente, en la producción del éster 2-halozincpropionato lo mejor es que sea baja y puede variar entre -30 °C y la temperatura de ebullición a presión atmosférica del disolvente empleado. Al menos la temperatura está por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente a presión atmosférica. A temperaturas más elevadas la formación del reactivo de Reformatsky se ve obstaculizada, por ejemplo, debido al homoacoplamiento de los ésteres y la liberación concomitante de sales de zinc que inhiben la reacción, y se evita de este modo la conversión completa y se influencia la precipitación. Preferentemente, la temperatura está comprendida entre -30 °C y 85 °C, más preferentemente entre -10 °C y 40 °C y más preferentemente todavía entre -10 °C y 10 °C. Aún más preferentemente, la temperatura está cerca de 0 °C, p. ej., entre -2 °C y 2 °C.

En consecuencia, la temperatura que se emplea en el paso (i) del proceso de acuerdo con la invención puede variar entre -30 °C y la temperatura de ebullición a presión atmosférica del disolvente empleado. Preferentemente, la temperatura en el paso (i) está por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente a presión atmosférica. Más preferentemente, la temperatura en el paso (i) está comprendida entre -30 °C y 85 °C, aún más preferentemente entre -10 °C y 40 °C y más preferentemente todavía entre -10 °C y 10 °C. Aún más preferentemente todavía, la temperatura en el paso (i) está cerca de 0 °C, p. ej., entre -2 °C y 2 °C.

Además, la temperatura que se emplea en el paso (iii) del proceso de acuerdo con la invención puede variar preferentemente entre -30 °C y la temperatura de ebullición a presión atmosférica del disolvente empleado. Más preferentemente, la temperatura en el paso (iii) está por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente a presión atmosférica. Aún más preferentemente, la temperatura en el paso (iii) está comprendida entre -30 °C y 85 °C, más preferentemente todavía entre -10 °C y 40 °C y aún más preferentemente todavía entre 10 °C y 30 °C. Lo más preferible es que la temperatura en el paso (iii) sea la temperatura ambiente, p. ej., entre 15 °C y 25 °C.

Los disolventes empleados en los pasos (i) y (iii) del proceso de la invención son disolventes apróticos. Preferentemente, los disolventes son disolventes apróticos polares. Como alternativa, se utilizan disolventes apróticos apolares combinados con disolventes apróticos polares. Los disolventes adecuados son tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, éter *tert*-butil metílico, éter diisopropílico, éter dietílico, acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano o tolueno. Los disolventes preferidos en los pasos (i) y (iii) del proceso de la invención son independientemente tetrahidrofurano y 2-metiltetrahidrofurano.

Los disolventes empleados en los pasos (i) y (iii) del proceso de acuerdo con la invención pueden ser idénticos o diferentes. Más preferentemente, los disolventes empleados en los pasos (i) y (iii) del proceso de acuerdo con la presente invención son idénticos. Aún más preferentemente, el disolvente en los pasos (i) y (iii) es tetrahidrofurano o 2-metiltetrahidrofurano.

El éster 2-halozincpropionato se puede obtener mediante una reacción entre un éster 2-halopropionato y zinc metálico. Fürstner describe la activación del zinc (Capítulo 14, *The Reformatsky reaction in Organozinc Reagents*, Knochel and Jones, Oxford University Press, págs. 287-305, 1999). El zinc empleado en el proceso de acuerdo con la invención se puede activar convenientemente mediante el tratamiento del zinc con yodo o ácido o mediante el tratamiento reductor de una sal de zinc. El tratamiento reductor de una sal de zinc se puede realizar, por ejemplo, con litio, sodio, potasio o hidruro de diisobutilaluminio.

Además, el tamaño de las partículas del zinc metálico empleado en el proceso de acuerdo con la invención es, preferentemente, tan pequeño como sea posible. Las partículas más pequeñas proporcionan áreas superficiales mayores y de esta manera se potencian las interacciones en la reacción. Preferentemente, las partículas de zinc tienen un diámetro inferior a 50 µm, más preferentemente inferior a 10 µm, aún más preferentemente inferior a 5 µm. Las partículas de zinc con estos tamaños se denominan a menudo polvo de zinc. Combinado con el disolvente, el zinc está presente a menudo como una suspensión en el proceso de acuerdo con la invención. Esta suspensión se puede agitar durante la reacción de Reformatsky.

En la reacción entre un éster 2-halopropionato y el zinc metálico, el zinc se emplea en una proporción de 1 a 3 equivalentes molares respecto al 2-halopropionato, preferentemente en una proporción de 1 a 2 equivalentes molares, más preferentemente en una relación de 1 a 1.2 equivalentes molares respecto al 2-halopropionato.

De manera alternativa, el éster 2-halozincpropionato de acuerdo con la fórmula (II) se puede obtener mediante la reacción de un éster 2-halopropionato con un reactivo de dialquilzinc en presencia de un catalizador metálico adecuado. Como un ejemplo, se pueden utilizar el dietilzinc y el acetalacetato de níquel (II) descritos por Yang *et al.* en *Tetrahedron: Asymmetry* (2007, 18, 949-962).

En el paso (iii) del proceso de acuerdo con la reacción, se prefieren condiciones anhidras. Este tipo de condiciones se pueden obtener trabajando en una atmósfera inerte, p. ej., empleando nitrógeno o argón. En una atmósfera inerte de acuerdo con la invención está presente tan poca agua como sea posible. La atmósfera es inerte en el sentido de que no es reactiva en la síntesis química de acuerdo con la invención.

En el proceso de acuerdo con la invención, la secuencia de preparación del éster de acuerdo con la fórmula (II) (paso (i)) y la adición de la cetona de acuerdo con la fórmula (III) (paso (ii)) se pueden intercambiar. En una

realización de la invención, se añadió la cetona después de que el éster 2-halopropionato hubiera reaccionado con el zinc para formar el reactivo de Reformatsky (WO2009035684). De manera alternativa, la cetona ya está presente y los reactivos para la preparación del éster 2-halozincpropionato se añaden posteriormente (condiciones de Barbier). El exceso de zinc se elimina tras la finalización del paso (i) y antes de que comience la precipitación. La eliminación del exceso de zinc se puede realizar por filtración.

Después de la reacción de Reformatsky, se permite que precipite el diastereómero deseado del éster de acuerdo con la fórmula (I). Uno de los factores para permitir que el éster precipite es dejar que la mezcla de reacción repose durante un cierto periodo de tiempo. Preferentemente, la reacción se dejar durante más de 12 horas tras la adición del último reactivo, más preferentemente durante más de 6 horas, aún más preferentemente durante más de 2 horas y más preferentemente todavía durante más de 0.5 hora. Durante el tiempo de espera, la agitación de la mezcla de reacción puede proceder como anteriormente. La precipitación se puede estimular añadiendo una pequeña cantidad de un precipitado que contenga el diastereómero deseado, que se ha obtenido anteriormente. Además, la precipitación se puede estimular y se puede mejorar el rendimiento añadiendo un disolvente apolar no prótico tal como éter *tert*-butil metílico o *n*-heptano.

El precipitado obtenido en el paso (iii) del proceso de acuerdo con la invención se aísla por filtración. Posteriormente, el diastereómero deseado del éster (I) se obtiene por extracción con un disolvente orgánico tal como acetato de etilo. Convenientemente, esta extracción conlleva el tratamiento con una solución ácida acuosa. Opcionalmente, la solución orgánica que contiene el éster (I) se concentra para proporcionar un sólido antes del paso de resolución enzimática posterior.

Se prefiere particularmente un proceso de acuerdo con la presente invención, donde la enzima esterasa utilizada para la resolución es un polipéptido aislado con actividad esterasa que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N.º 4 o un homólogo de esta que tiene una identidad de aminoácidos de al menos un 90%.

SEQ ID N.º 4:

MGQPASPPVVDTAQGRVLGKYVSLEGLAQPVAVFLGVPFAKPLGSLRFAPPQPAEPWSFVKNTTSYPPMCCQEPI
GGQMLSDLFTNRKERLIPEFSEDCLYLNIIYTPADLTKRGRLPVMVWIHGGGLVVGASTYDGLALAAHENVVVAIQY
RLGIWGFSTGDEHSRGNWGHLDQVAALHWWQENIANFGGDPGSVTIFGESAGGESVSVLVLSPLAKNLFHRAISES
GVAFTAGLVVRKDMKAAAKQIAVLAGCKTTTTSAVFVHCLRQKSEDELLDLTKMKFFALDLHGDPRESHPFLTTVVDDGV
LLPKMPEEILA EKDFNTVPYIVGINKQEFGWLLPTMMGFPLSEGKLDQKTATSLWKSYPYIANIPEELTPVATDKYLGGT
DDPVKKKDLFLDLMGDVVFGVPSVTVARQHRDAGAPTYMYEFQYRPSFSSDKPKTVIGDHGDEIFSVFGFPLKGD
APEEEVSLSKTVMKFWANFARSGNPNGEGLPHWPMYDQEEGYLQIGVNTQAAKRLKGEEVAFWNDLLSKEAAKPK
PKIKHAEL

La esterasa mostrada en la SEQ ID N.º 4 y los homólogos de esta se describen en los documentos WO2009/004039 y WO2010/122175.

Preferentemente, dicha enzima esterasa tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID N.º 4, más preferentemente al menos un 97%, aún más preferentemente al menos un 98% y más preferentemente todavía más de un 99% de identidad con la SEQ ID N.º 4.

Se prefiere aún más un proceso de acuerdo con la presente invención, donde la enzima esterasa es un polipéptido aislado con actividad esterasa que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N.º 2 o un homólogo de esta que tiene una identidad de aminoácidos de al menos un 90%, donde dicho homólogo contiene valina como aminoácido en la posición 239 de dicha secuencia o la posición correspondiente a ella.

SEQ ID N.º 2:

MGQPASPPVVDTAQGRVLGKYVSLEGLAQPVAVFLGVPFAKPLGSLRFAPPQPAEPWSFVKNTTSYPPMCCQEPI
GGQMLSDLFTNRKERLIPEFSEDCLYLNIIYTPADLTKRGRLPVMVWIHGGGLVVGASTYDGLALAAHENVVVAIQY
RLGIWGFSTGDEHSRGNWGHLDQVAALHWWQENIANFGGDPGSVTIFGESAGGESVSVLVLSPLAKNLFHRAISES
GVAFTAGLVVRKDMKAAAKQIAVLAGCKTTTTSAVFVHCLRQKSEDELLDLTKMKFFALDLHGDPRESHPFLTTVVDDGV
LLPKMPEEILA EKDFNTVPYIVGINKQEFGWLLPTMMGFPLSEGKLDQKTATSLWKSYPYIANIPEELTPVATDKYLGGT
DDPVKKKDLFLDLMGDVVFGVPSVTVARQHRDAGAPTYMYEFQYRPSFSSDKPKTVIGDHGDEIFSVFGFPLKGD
APEEEVSLSKTVMKFWANFARSGNPNGEGLPHWPMYDQEEGYLQIGVNTQAAKRLKGEEVAFWNDLLSKEAAKPK
PKIKHAEL

El documento WO 2010/122175 ha dado a conocer la mutación de la enzima esterasa de la SEQ ID N.º 4 (APLE) que reemplaza la leucina en la posición 239 de dicha secuencia con valina.

Como es sabido, la numeración de los aminoácidos depende de la especie a partir de la cual se origina la proteína. La numeración también puede cambiar como resultado de eliminaciones o inserciones. Sin embargo, un experto en la técnica sabe como alinear secuencias. Por lo tanto, a los efectos de esta solicitud, la frase "o correspondiente a ella" se utiliza para describir posiciones de aminoácidos que, excepto por el número, son idénticos a la posición 239 de la SEQ ID N.º 2.

Preferentemente, la enzima esterasa tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID N.º 2, más preferentemente al menos un 97%, aún más preferentemente al menos un 98% y más preferentemente todavía más de un 99% de identidad con la SEQ ID N.º 2.

5 Las enzimas que pertenecen a esta categoría son principalmente esterasas de hígado de cerdo o variantes de estas. Por lo tanto, en una realización, la invención también se refiere al proceso de acuerdo con la invención donde la resolución enzimática del paso (iv) se lleva a cabo con esterasas de hígado de cerdo o variantes de estas, en particular con una enzima esterasa de la SEQ ID N.º 2 o 4, más preferentemente la SEQ ID N.º 2.

10 En la presente solicitud la expresión "una esterasa que tiene al menos un 90% de identidad secuencial respecto a la secuencia de aminoácidos de (una secuencia de referencia)" se refiere a que una proteína de este tipo es un homólogo de la secuencia de referencia respectiva que tiene una secuencia de aminoácidos, la cual es idéntica en al menos un 90% a la secuencia de aminoácidos de la secuencia de referencia según lo determina la alineación de secuencias llevada a cabo con herramientas para el alineamiento de secuencias tales como BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>) o Align Plus 5 (Scientific & Educational Software, Cary, NC, EE. UU.).

15 A los efectos de la presente solicitud, el término "homólogo" también se pretende que incluya secuencias de ácidos nucleicos (secuencias polinucleotídicas) que difieran de otra secuencia de ácidos nucleicos debido a la degeneración del código genético y que codifiquen la misma secuencia polipeptídica.

20 La similitud o identidad secuencial se define en la presente como una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias de ácidos nucleicos, según lo determina la comparación de las secuencias. Normalmente, las similitudes o identidades secuenciales se comparan a lo largo de toda la longitud de las secuencias pero, sin embargo, también se puede comparar únicamente una parte de las secuencias cuando se alinean una con la otra. En la técnica, los términos "identidad" o "similitud" también se refieren al grado de relación secuencial entre secuencias polipeptídicas o secuencias de ácidos nucleicos, según sea el caso, tal como lo determina la coincidencia entre secuencias de este tipo. Los métodos preferidos para determinar la identidad o similitud se diseñan para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias evaluadas. En el contexto de esta invención, un método constituido por un programa informático preferido para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluye BLASTP y BLASTN (Altschul, S. F. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 1990, 215, 403-410, disponible públicamente de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S. *et al.*, NCBI NLM NIH, Bethesda, MD, EE. UU.). Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias polipeptídicas utilizando BLASTP son 10.0 para la apertura de hueco, 0.5 para la extensión del hueco, matriz 62 Blosum. Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos utilizando BLASTN son 10.0 para la apertura de hueco, 0.5 para la extensión del hueco, matriz completa de ADN (matriz de identidad de ADN).

En la resolución enzimática de acuerdo con la invención se pueden modificar varios parámetros de reacción tales como el disolvente, codisolvente, pH, temperatura y concentración de sustrato con el fin de optimizar la reacción.

35 Generalmente, el disolvente puede ser una mezcla de agua con un disolvente miscible con el agua, por ejemplo, con un alcohol tal como metanol, etanol, isopropanol o *tert*-butanol, o con dioxano, tetrahidrofurano, acetona o sulfóxido de dimetilo o un sistema bifásico de agua y un disolvente inmiscible con el agua, por ejemplo, un compuesto aromático tal como tolueno o xileno, un alcano tal como *n*-hexano, *n*-heptano o ciclohexano, o un éter tal como éter diisopropílico o éter *tert*-butil metílico.

40 La naturaleza del codisolvente en la resolución enzimática de acuerdo con la invención desempeña un papel crucial ya que, por ejemplo, no se observó conversión cuando se utilizó 2-metiltetrahidrofurano. Preferentemente, se utilizan *tert*-butanol, acetato de *tert*-butilo, cetona metil isobutilica o tolueno como codisolvente. Más preferentemente, se utiliza tolueno como codisolvente para la resolución enzimática.

45 El efecto del pH sobre la actividad enzimática no es crucial. El pH de la solución de reacción está comprendido entre 4 y 11, preferentemente entre 6 y 9. Sin embargo, más preferentemente, el pH óptimo para la resolución enzimática de acuerdo con la invención se encuentra en el intervalo comprendido entre un pH de 7.5 y 8.

50 La temperatura de reacción para la conversión de la invención está comprendida normalmente entre 0 y 90 °C, preferentemente entre 10 y 60 °C. La reacción de resolución enzimática de acuerdo con la invención es más rápida a temperaturas más elevadas. Sin embargo, la actividad enzimática disminuye con el tiempo a 37 °C. Por lo tanto, la temperatura durante la resolución enzimática está comprendida más preferentemente entre 28 y 37 °C.

Las concentraciones de sustrato para la resolución enzimática pueden variar de un 0.1 a un 50 por ciento en peso, preferentemente de un 1 a un 25 por ciento en peso, más preferentemente de un 2 a un 10 por ciento en peso. Más preferentemente, la concentración de sustrato está comprendida entre un 4 y un 6 por ciento en peso.

55 La esterasa de acuerdo con esta invención se puede utilizar en cualquier forma. La esterasa se puede utilizar, por ejemplo, en forma de una dispersión, una solución o en forma inmovilizada. Además, la esterasa se puede utilizar, por ejemplo, como una enzima cruda, como una enzima comercializada, como una enzima purificada adicionalmente a partir de una preparación comercializada, como una enzima obtenida de su fuente mediante una combinación de

métodos de purificación conocidos, en células íntegras (inmovilizadas y/o permeabilizadas opcionalmente) que poseen, de manera natural o gracias a la modificación genética, la actividad esterasa requerida, o en un lisado de células con una actividad de este tipo.

5 Después del paso de resolución enzimática, el aislamiento del producto puede tener lugar por métodos convencionales tales como extracción, cristalización, cromatografía en columna y/o destilación.

10 El éster obtenido después del paso (iv) del proceso de acuerdo con la invención se puede convertir en la amida correspondiente mediante métodos conocidos en la técnica, p. ej., mediante tratamiento con amoníaco. Posteriormente, la amida se convierte adicionalmente en isavuconazol o ravuconazol mediante métodos conocidos, p. ej., como se divulga en el documento WO03/002498. La amida se puede deshidratar en el cianuro correspondiente y el cianuro se puede convertir en la tioamida correspondiente mediante, p. ej., la reacción con una sal de sulfuro tal como el sulfuro de amonio y finalmente la tioamida se puede convertir en isavuconazol o ravuconazol mediante la reacción con un reactivo de tipo 4-cianofenona sustituido de manera apropiada tal como, p. ej., α -bromo-4-cianoacetofenona.

15 La invención además se refiere a todas las combinaciones posibles de diferentes realizaciones y/o características preferidas de acuerdo con el proceso de acuerdo con la invención tal como se describen en la presente.

La invención se esclarecerá haciendo referencia a los siguientes ejemplos sin estar, sin embargo, restringida por estos.

EJEMPLOS

20 El exceso diastereomérico del éster (I) se determinó por GC: GC: columna HP-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m); Temp. inic.: 50 °C, 0 min., 20 °C/min hasta 150 °C, 150 °C durante 0 min.; 10 °C/min hasta 190 °C, 190 °C durante 2 min.; 20 °C/min hasta 300 °C, 300 °C durante 0 min.; Tiempos de retención: 2.06 min.: propionato de etilo; 3.25 min.: 2-bromopropionato de etilo; 9.17 min.: cetona II ($R_1 = F$); 12.82 min.: *RS/SR*-éster I; 12.90 min.: *RR/SS*-éster I

25 $^1\text{H-RMN}$ del *RR/SS*-éster I (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 1.04$ (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 3.30 (c, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.25 (c, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.60 (d, $J = 14.1$ Hz, 1H), 4.89 (d, $J = 14.4$ Hz), 6.95 (m, 2H), 7.20 (m, 1H), 7.75 (s, 1H), 8.11 (s, 1H) ppm.

$^1\text{H-RMN}$ del *RS/SR*-éster I (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 0.98$ (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.41 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 3.37 (c, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.95 (m, 2H), 4.61 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 4.83 (d, $J = 14.1$ Hz), 6.97 (m, 3H), 7.71 (s, 1H), 8.08 (s, 1H) ppm.

Ejemplo comparativo A: Preparación del éster (I) racémico mediante un acoplamiento organolítico

a) Preparación de una solución madre de diisopropilamida de litio (LDA) en tetrahidrofurano (THF):

30 Se disolvió diisopropilamina (716 mg, 7.1 mmol, 1.05 eq) en THF anhidro (21.3 mL) y la solución resultante se enfrió hasta -78 °C en una atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se añadió *n*-BuLi (solución 2.7 M en *n*-heptano, 2.5 mL, 6.7 mmol, 1.0 eq) gota a gota durante 15 minutos y la mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 15 minutos más. A continuación la solución se calentó hasta 0 °C y se agitó durante 30 minutos tras los cuales la solución madre se enfrió a -78 °C de nuevo.

35 b) Reacción de acoplamiento:

40 La solución de LDA obtenida de esta manera (3.66 mL, 0.98 mmol, 1.1 eq) se transfirió a un recipiente Schlenk y se añadió propionato de etilo (100 mg, 0.98 mmol, 1.1 eq.) gota a gota a -78 °C en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a -78 °C durante 30 minutos y a continuación se añadió 1-(2,5-difluorofenil)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)etanona (200 mg, 0.90 mmol, 1.0 eq.) en THF (3.66 mL) gota a gota durante 15 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a -78 °C y a continuación se desactivó con ácido acético y se calentó hasta temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con NH_4Cl saturado acuoso y acetato de etilo. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2x) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar un aceite amarillo que contenía el éster I racémico con un exceso diastereomérico de un 29% en favor del diastereómero deseado *RR/SS*. Una purificación adicional por cromatografía en columna (*n*-heptano/*EtOAc*/*MeOH* 60/40/5 v/v/v) proporcionó el diastereómero *RR/SS* (sólido amarillo claro) así como también el diastereómero *RS/SR* (sólido blancuzco) con un rendimiento global combinado de 179 mg (0.55 mmol, 61%).

Ejemplo comparativo B: Reacción de Reformatsky de acuerdo con los pasos (i), (ii) y (iii) a temperatura elevada con la cetona estando presente (condiciones de Barbier)

50 Se colocó zinc (1.1 g, 17 mmol, 3.8 eq.) en un matraz de 2 bocas con un refrigerante y se calentó al vacío utilizando una pistola de aire caliente (3 ciclos de nitrógeno-vacío). Posteriormente, se añadió THF (60 mL) y a continuación cloruro de trimetilsililo (0.15 mL). La suspensión resultante se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 15 minutos, tras lo cual se añadió una solución de la cetona III ($R_1 = F$, 1.0 g, 4.5 mmol, 1.0 eq.) en

THF (30 mL). A continuación se calentó la mezcla de reacción hasta 66 °C, tras lo cual se retiró la fuente de calor. Posteriormente, se añadió una solución de 2-bromopropionato de etilo (0.87 mL, 1.2 g, 6.7 mmol, 1.5 eq.) en THF (20 mL) gota a gota durante 10 minutos. A continuación se agitó la mezcla de reacción a 66 °C durante 1.5 horas, tras lo cual se enfrió hasta temperatura ambiente. La reacción se desactivó añadiendo una solución de cloruro de amonio acuoso saturado (100 mL) y se diluyó con éter *tert*-butil metílico (MBTE, 100 mL). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con MTBE (2 x 100 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar un aceite amarillo (1.4 g) que contenía el éster I racémico. Los análisis por ¹H-RMN y GC mostraron una conversión de la cetona III (R₁ = F) de un 80% y un e.d. del éster I de un 60% en favor del diastereómero *RR/SS* deseado. El producto no se purificó más.

10 Ejemplo 1: Reacción de Reformatsky de acuerdo con el paso (iii) con la formación previa de un reactivo de Reformatsky a baja temperatura seguida por la adición a la cetona

a) Preparación de una solución madre del reactivo de Reformatsky:

15 Se colocó zinc (5.8 g, 89 mmol, 2.0 eq.) en un matraz de dos bocas en una atmósfera de nitrógeno y se añadió THF anhidro (101 mL) y a continuación cloruro de trimetilsililo (TMSCl, 1.12 mL). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y a continuación se enfrió a 0 °C. Posteriormente, se añadió 2-bromopropionato de etilo (5.8 mL, 8.1 g, 44.7 mmol, 1.0 eq.) a la suspensión gota a gota durante 10 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos más y a continuación se filtró en una atmósfera de nitrógeno y se transfirió a un recipiente Schlenk para eliminar el zinc residual.

20 Se colocó la cetona III (R₁ = F, 1.0 g, 4.5 mmol, 1.0 eq.) en un recipiente Schlenk y se añadió THF anhidro (10 mL) en una atmósfera de nitrógeno. A la solución resultante se añadieron 20 mL de la solución madre preparada previamente del reactivo de Reformatsky (véase más arriba, 8.36 mmol, 1.9 eq.) gota a gota durante 30 minutos a temperatura ambiente mientras se agitaba. Después de finalizar la adición, la mezcla de reacción resultante se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 36 horas (solución transparente). El análisis por GC mostró que se había formado el éster I (R₁ = F) con un 80% de conversión basándose en la cetona III (R₁ = F) y un e.d. de un 60% en favor del diastereómero *RR/SS* deseado. La mezcla de reacción se concentró al vacío hasta un volumen de 10 mL tras lo cual se añadió *n*-heptano hasta que se observó la formación de un sólido. La suspensión resultante se agitó durante 16 horas, tras lo cual se aisló el sólido por filtración. A continuación se disolvió el sólido en una mezcla de HCl acuoso (pH = 1) y acetato de etilo, lo que dio como resultado un sistema bifásico transparente. Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2x). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar el *RR/SS*-éster I racémico (R₁ = F) como un sólido amarillo claro con un d.e. > 99% según se determinó por GC.

25 Ejemplo 2: Reacción de Reformatsky de acuerdo con el paso (iii) eliminando el zinc antes de la adición de la cetona

30 Se suspendió zinc (11.7 g, 179 mmol, 4.0 eq.) en THF (200 mL) y se agitó en presencia de TMSCl (2.25 mL) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 30 minutos en un matraz de 3 bocas de 250 mL. Posteriormente, se enfrió la suspensión hasta 0 °C y se añadió 2-bromopropionato de etilo (11.6 mL, 89.6 mmol, 2.0 eq) mediante una bomba de jeringa durante 45 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos más a 0 °C (la conversión, controlada por GC, fue de un 100%), tras lo cual la suspensión se filtró mediante una cánula sobre un filtro de vidrio en una corriente de nitrógeno y se introdujo en el recipiente de reacción (matraz de 3 bocas de 500 mL). Posteriormente, se añadió una solución de la cetona III (R₁ = F, 10 g, 44.8 mmol, 1.0 eq.) en THF (130 mL) a la mezcla de reacción durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 72 horas más, momento en el cual se había formado un sólido. Se filtró la suspensión y el sólido blancuzco se suspendió en EtOAc y se disolvió añadiendo agua y HCl acuoso hasta que se obtuvo un sistema bifásico transparente (pH 1). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (2x). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar el *RR/SS*-éster I racémico (R₁ = F, 8.8 g, 27 mmol, 60%) como un sólido amarillo claro con un d.e. > 99% según se determinó por GC. El filtrado se sometió al mismo tratamiento acuoso. El análisis por GC mostró que la cetona restante estaba presente en el filtrado así como también el éster I racémico con un e.d. de -25% (en favor del diastereómero *RS/SR* no deseado).

35 Ejemplo 3: Reacción de Reformatsky de acuerdo con el paso (iii) eliminando el zinc tras la adición de la cetona pero antes del comienzo de la precipitación

40 Se suspendió zinc (98 g, 1.5 mol, 4.0 eq.) en THF (1.7 mL) y se agitó mecánicamente en presencia de TMSCl (18.7 mL) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se enfrió la suspensión hasta 0 °C y se añadió 2-bromopropionato de etilo (96.6 mL, 744 mmol, 2.0 eq) mediante una bomba de jeringa durante 1 hora. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a 0 °C (la conversión, controlada por GC, fue de un 100%), tras lo cual se añadió una solución de la cetona III (R₁ = F, 83 g, 372 mmol, 1.0 eq.) en THF (830 mL) durante 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 15 minutos más (la conversión, controlada por GC, fue > 90%) y a continuación se filtró sobre celite. Se determinó por GC que el e.d. de la mezcla de reacción fue de un 60%. Al agitar la mezcla de reacción, comenzó a formarse una suspensión después de 5 horas. La suspensión se agitó durante 88 horas, punto en el que el e.d. de la solución madre había disminuido hasta -10% (en favor del diastereómero *RS/SR* no deseado). Se filtró la suspensión y el sólido blancuzco se lavó con

MTBE (2 x 125 mL). Se suspendió el sólido posteriormente en EtOAc (2.1 L) y se disolvió añadiendo agua (1.25 L) y HCl acuoso (10% p/p; 76 g) hasta que se obtuvo un sistema bifásico transparente (pH 1.3). Se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con HCl acuoso (1.1 L, pH 1.1), NaHCO₃ acuoso (500 mL que contenían 0.60 g de NaHCO₃), agua (2 x 250 mL) y salmuera (250 mL). A continuación se secó la fase orgánica (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el *RR/SS*-éster I racémico (54 g, 167 mmol, 45%) con un 97% de e.d.

Ejemplo 4: Resolución enzimática de acuerdo con el paso (iv)

A una solución tamponada de fosfato de potasio (500 mL, 50 mM, pH 7.8) se añadió una suspensión (100 mL) que contenía la esterasa de la SEQ ID N.º 1 (10 g, células de *Escherichia coli* íntegras que expresan el gen de la esterasa recombinante de la SEQ ID N.º 1 que codifica la esterasa de la SEQ ID N.º 2, preparada según se describe en el documento WO2010/122175). Se ajustó el pH a 7.8 y posteriormente se añadió una solución del *RR/SS*-éster I racémico (R₁ = F, 40 g, 123 mmol, 97% e.d.) en tolueno (400 mL). Se agitó la mezcla resultante a 28 °C a la vez que se mantenía el pH a 7.8 mediante la titulación con NaOH (1 M, ac.). El análisis por HPLC mostró que el e.e. del *R,R*-éster I fue de un 98.5% después de 22 horas. Después de 26 horas, la reacción se sometió a un tratamiento como el que se describe posteriormente. *N.B.* las reacciones con la proporción S/C de 2:1 y 3:1 finalizaron ambas en 20 horas o menos; e.e. del *R,R*-éster I >99%.

SEQ ID N.º 1:

ATGGGACAACCAGCTTCGCCGCTGTCGTTGATACCGCTCAAGGACGAGTCTTGGGTAAGTACGTCTCTTTAGA
 GGGATTGGCACAACCGGTTGCTGTCTTCTTGGGAGTCCCTTTTGCTAAGCCACCTCTTGGATCTTTGAGGTTTGC
 CCCGCCGCAACCAGCAGAGCCATGGTCTTTTCGTTAAGAACAACACTACTTCTACCCTCCAATGTGTTGTCAGAACC
 AATCGGAGGACAAATGCTTTTCAGACCTATTCACTAACAGAAAGGAAAGGCTTATCCCGGAGTCTCTGAGGATTG
 CCTTTACCTAAATATTTACACTCCTGCCGATTTGACAAAGAGGGGTAGGTTGCCGGTTATGGTTTGGATTTCATGG
 AGGAGGTTTGGTTGTTGGCGGAGCATCCACTTATGACGGATTGGCTCTTGCCGCGCACGAGAACGTTGTTGTTG
 TTGCTATTCAATACCGTTTGGGTATTTGGGGATTTTCTCCACAGGAGATGAGCATTCCCGTGGAAACTGGGGCC
 ATTTAGATCAAGTTGCTGCATTGCATTGGGTCCAAGAAAACATTGCTAACTTCGGAGGTGATCCAGGTTCTGTTA
 CTATTTTCGGAGAATCAGCAGGCGGAGAGAGTGTCTCTGTATTGGTTTTATCACCATTAGCTAAGAACCTTTTTCA
 TCGTGCTATTTCCGAAAGTGGTGTGCTTTTACCGCCGGTGTGGTCAGGAAGGATATGAAGGCCGACGCCAAGC
 AGATCGGTGCTTGCAGGATGCAAAACACTACTTTCGGGCAGTCTTCGTCATTGTTTGGCGTCAAAAGTGGGAAAG
 ATGAACCTTTAGACCTCACGTTGAAGATGAAATCTTTGCCCTTGACTTACACGGAGATCCAAGGGAATCTCACCC
 CTTTTTGGACCACTGTTGTTGACGGAGTTTGTGCTAAGATGCCTGAGGAAATCTTGGCCGAGAAGGACTTTA
 ACACCGTCCCATACATTGTTGGAATTAACAAGCAGGAGTTCGGATGGCTTTTGGCAACGATGATGGGATTTCCCTC
 TTTCCGAGGAAAGTTGGATCAAAAGACGGCTACGTCACCTTTGTGGAAGTCCACCCAATTGCCAACATTCCTG
 AAGAGTTGACCCAGTTGCTACCGATAAGTATTTAGGAGGAACAGATGATCCTGTCAAAAAGAAAGATTTGTTTT
 GGTACTGATGGGAGACGTTGTTTTCGGCGTCCCACAGTACGGTTGCTCGTCAGCATAGGGGACGACGAGGACT
 CCAACTTACATGATGAGTTCCAATATGCTCCATCTTTTCATCGGATAAGAAACCTAAGACGGTTATTGGAGATC
 ATGGAGACGAAATTTTTCCGCTTCCGCTTCCATTGCTCAAAGGTGACGCTCCAGAGGAAGAAGTCAGTCTTT
 CTAAGACGGTTATGAAATTTTGGGCTAACTTCGCCCGTAGTGAAACCCTAATGGAGAAGGATTGCCTCACTGG
 CCGATGTACGATCAAGAGGAGGGATACCTTCAAATTTGGTGTCAACACTCAAGCAGCTAAGAGGTTGAAAGGCCGA
 GGAGGTTGCTTTTTGGAACGACCTGTTGTCCAAGGAAGCAGCAAAGAAGCCACCTAAGATAAAGCACGCCGAAT
 TGTA

40 Tratamiento:

Se añadió dicalita 4208 (20 g) a la mezcla de reacción y la suspensión resultante se agitó durante 5 minutos. Posteriormente, la mezcla se filtró sobre un filtro de vidrio (dicalita 4108) recubierto previamente. La masa húmeda de filtración se lavó con tolueno (2 x 200 mL) y se separó el filtrado combinado. En esta etapa, la fase toluénica se había emulsionado ligeramente, de modo que se llevó a cabo una segunda filtración sobre un filtro recubierto previamente. El filtrado bifásico resultante se separó y la fase acuosa se añadió a la fase acuosa obtenida anteriormente. Las fases acuosas combinadas se extrajeron entonces con tolueno (250 mL) lo que proporcionó una fase orgánica totalmente emulsionada. La fase toluénica se filtró dos veces sobre un filtro recubierto previamente, tras lo cual se obtuvo un sistema bifásico transparente. Las fases se separaron y las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ acuoso (100 mL, 5% en peso). Finalmente, la fase orgánica se concentró al vacío para proporcionar el *R,R*-éster I como un sólido blancuzco.

Utilizando el protocolo obtenido de esta manera, se convirtieron 210 g del *RR/SS*-éster I racémico (e.d. 97%) en cinco lotes, conteniendo cada uno 40-45 gramos del material de partida. Se aisló el *R,R*-éster I enantiopuro (e.d. 95%; ee. >99.5%) con un rendimiento de un 48% (101 g, 311 mmol).

Análisis:

55 La determinación del e.e. del éster I se realizó por HPLC quiral. Se desarrolló un único método que separaba los enantiómeros del *RR/SS*-éster I racémico así como los enantiómeros del ácido carboxílico correspondiente:

5 Columna Daicel AD, 2 x 50 x 4.6 mm ID, tamaño de las partículas: 10 µm, eluyente: heptano/MeOH/EtOH 95:2.1:2.9 v/v/v + 0.05% de ácido trifluoroacético + 0.05% de dietilamina; duración: 15 min, Presión: 10 bar, Flujo: 1.8 mL/min, Temperatura: 20 °C, detección UV a 210 nm. Tiempos de retención: enantiómero *SS* del éster I: 2.15 min.; enantiómero *SS* del ácido carboxílico: 3.02 min.; enantiómero *RR* del ácido carboxílico: 4.31 min.; enantiómero *RR* del éster I: 8.21 min.

Se confirmó la conversión midiendo la concentración tanto del éster I como del ácido carboxílico por HPLC.

10 Columna Hypersil BDS-3, 250 x 4.6 mm ID, tamaño de partículas: 5 µm, eluyente A: 0.15% de ácido fórmico y 0.025% de trietilamina en Milli-Q; eluyente B: 0.15% de ácido fórmico y 0.025% de trietilamina en acetonitrilo, gradiente de A:B = 95:5 (v/v) a 5:95 en 10 min, se mantiene a 5:95 durante 5 min, hasta 95:5 en 3 min, se mantiene en 95:5 durante 5 min (t = 23 min). Flujo: 1.0 mL/min, temperatura: 40 °C, detección UV a 210 nm. Tiempos de retención: ácido carboxílico: 9.55 min.; éster I 12.35 min.

Ejemplo 5: Cribado enzimático

15 En un cribado de más de 200 enzimas hidrolasa (lipasas, esterases, proteasas) para la hidrólisis de éster I, se incubaron 225 µL de cada enzima individual en tampón de fosfato de potasio 100 mM pH 7.5 con 2 mg del éster I disuelto en *tert*-butanol en un volumen final de 250 µL en viales de vidrio con tapón y se incubaron a 28 °C en un agitador IKA KS 130 (IKA, Staufen, Alemania) a 400 rpm. Después de la incubación durante toda la noche se añadieron 40 µL de ácido fosfórico a cada vial, se diluyeron posteriormente con 710 µL de éter *tert*-butil metílico (MTBE) y se centrifugaron durante 20 min a 3500 rpm en una centrífuga Avanti J-20XPI equipada con un rotor JS-5.3 (Beckman Coulter, Woerden, Países Bajos).

20 El exceso enantiomérico (e.e.) tanto del éster restante como del ácido carboxílico resultante se determinó por HPLC (tal como se ha descrito anteriormente). Se calculó la conversión comparando estos dos valores de e.e.:

$$\text{conversión} = [\text{e.e. del éster} / (\text{e.e. del éster} + \text{e.e. del ácido carboxílico})] * 100\%$$

De este gran conjunto de hidrolasas únicamente 8 esterases de hígado de cerdo recombinantes pudieron hidrolizar preferentemente al enantiómero no deseado del éster I (Tabla 1).

25 Tabla 1: resultados del cribado enzimático

Esterasa	e.e. del éster I	e.e. del ácido	conversión
[SEQ ID No.]	%	%	%
2	92.1	94	50
4	69.6	94	42
6	18.6	97	16
8	10.3	99	9
10	78.4	74	51
12	15.1	64	19

30 Este ejemplo muestra que varias esterases de hígado de cerdo recombinantes hidrolizan el éster I enantioselectivamente. Las enzimas esterasa que muestran las SEQ ID N.^{os} 4, 6, 8, 10 o 12 se pueden preparar utilizando células de *Escherichia coli* que expresan los genes de la esterasa recombinantes de las SEQ ID N.^{os} 3, 5, 7, 9 u 11, que codifican respectivamente dichas esterases de acuerdo con la descripción en los documentos WO2009/004093 y WO2010/122175.

Ejemplo 6: Reevaluación de esterases de hígado de cerdo recombinantes

35 En función de los resultados del cribado enzimático inicial, se seleccionaron 5 enzimas para una reevaluación a una escala de 250 mg. La selección de las enzimas se basó en la actividad y selectividad respecto al éster I. Para cada reacción individual se disolvieron 250 mg del éster I en 1 mL de *tert*-butanol. Posteriormente, se añadieron 5 mL de tampón de fosfato de potasio 100 mM pH 7.5 y 4 mL de extracto exento de células que contenía las respectivas esterases de hígado de cerdo recombinantes sobreexpresadas en Metrohm 718 STAT Titrimos (Metrohm, Schiedam, Países Bajos) con una relación de enzima/sustrato de 1 mg de proteína total por 1 mg de éster I. Se mantuvo el pH constante a 7.5 con NaOH 1 M. En puntos temporales regulares, se analizaron las muestras para determinar el

40 exceso enantiomérico (e.e.) tanto del éster restante como del ácido carboxílico resultante que se determinaron por

ES 2 616 412 T3

HPLC (tal como se ha descrito anteriormente). Se calculó la conversión comparando estos dos valores de e.e. Los resultados se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2: Conversión y e.e. de reacciones de hidrólisis catalizadas por esterasas de hígado de cerdo del éster I en el ácido carboxílico correspondiente. - = no determinado

Tiempo (h)	SEQ ID NO. 2			SEQ ID NO. 4		
	e.e. del éster I (%)	e.e. del ácido (%)	del conversión (%)	e.e. del éster I (%)	e.e. del ácido (%)	del conversión (%)
1	-	-	-	2.6	80.3	3.1
2	32.5	99.9	24.5	3.9	90.0	4.1
3	50.7	99.7	33.7	5.7	91.8	5.9
5	99.5	99.6	50.0	8.3	92.0	8.3
7	99.3	99.9	49.9	14.1	91.6	13.3
23	99.9	99.9	50.0	27.6	92.4	23.0

Tiempo (h)	SEQ ID NO. 6			SEQ ID NO. 8		
	e.e. del éster I (%)	e.e. del ácido (%)	del conversión (%)	e.e. del éster I (%)	e.e. del ácido (%)	del conversión (%)
1	-0.5	99.9	0.5	1.2	99.9	1.2
3	1.2	99.9	1.2	1.5	83.2	1.8
5	2.5	96.9	2.5	1.0	99.9	1.0
7	3.3	96.6	3.3	2.3	99.9	2.3
23	12.7	92.9	12.0	5.9	99.3	5.6

Tiempo (h)	SEQ ID NO. 10		
	e.e. del éster I (%)	e.e. del ácido (%)	del conversión (%)
1	5.7	98.8	5.4
2	9.0	98.2	8.4
5	13.5	99.9	11.9
7	17.2	94.8	15.4

5

Las enantioselectividades (E) de la reacción de la esterasa individual se calcularon a partir de la conversión y el e.e. del ácido carboxílico producido de acuerdo con la fórmula:

$$E = \ln((1-(\text{conversión}/100)*(1+(\text{e.e.}_{\text{ácido}}/100))))/\ln((1-(\text{conversión}/100)*(1-(\text{e.e.}_{\text{ácido}}/100))))$$

y se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3: Enantioselectividad de la hidrólisis del éster I catalizada por esterasa de hígado de cerdo

Esterasa [SEQ ID No.]	Enantioselectividad E
2	> 500
4	30
6	30
8	> 200
10	45

- 5 La esterasa de hígado de cerdo recombinante de la SEQ ID N.º 2 se identificó como el mejor candidato con un 50% de conversión, un e.e. de un 99.5% para el éster I después de 5 h y una enantioselectividad excelente de E > 500.

Ejemplo 7: Influencia de los disolventes en las reacciones de la esterasa de hígado de cerdo

- 10 La influencia de los disolventes orgánicos en la hidrólisis del éster I por parte de la esterasa de hígado de cerdo de la SEQ ID N.º 2 se investigó utilizando células de *E. coli* recombinantes que expresaban el gen de la SEQ ID N.º 1, que se había producido tal y como se describe en el documento WO2010/122175. A 0.5 g del éster I se añadieron 7.5 mL de tampón de fosfato de potasio 50 mM pH 7.8, 0.1 g de células de *E. coli* recombinantes húmedas que contenían la esterasa de la SEQ ID N.º 1 (en 1 mL de tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.8) y 2.5 mL del disolvente orgánico a 28 °C. En reacciones por separado se añadieron como disolvente orgánico tolueno, cetona isobutil metílica, acetato de *tert*-butilo o 2-metil tetrahydrofurano. Como control se añadieron 2.5 mL de tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.8 en lugar de un disolvente orgánico.

15 El pH se mantuvo constante a 7.8 con NaOH 1 M. En puntos temporales regulares, se analizaron las muestras para determinar el exceso enantiomérico (e.e.) tanto del éster restante como del ácido carboxílico resultante que se determinaron por HPLC (tal como se ha descrito anteriormente). Se calculó la conversión comparando estos dos valores de e.e. (tal y como se ha descrito anteriormente). Los resultados se proporcionan en la Tabla 4

- 20 Tabla 4: Efecto de los disolventes orgánicos en la hidrólisis del *R,R/S,S*-éster I por parte de la esterasa de hígado de cerdo recombinante de la SEQ ID N.º 2.

sin disolvente	tiempo	e.e. del ácido	e.e. del éster I	conversión
	(h)	(%)	(%)	(%)
	2	4.6	94	4.7
	3	6.8	98.3	6.5
	4	7.6	98.2	7.2
	7	12.2	97.1	11.2
	22	40.5	98.4	29.2
tolueno	tiempo	e.e. del ácido	e.e. del éster I	conversión
	(h)	(%)	(%)	(%)
	2	10.1	98.0	9.3

ES 2 616 412 T3

	3	15.8	98.0	13.9
	4	21.7	98.0	18.1
	7	37.1	98.0	27.5
	22	99.3	99.2	50.0
acetato de <i>tert</i>-butilo	tiempo	e.e. del	e.e. del	conversión
	(h)	ácido	éster I	(%)
		(%)	(%)	(%)
	2	5.0	95.6	5.0
	4	9.0	97.4	8.4
	6	15.1	97.9	13.4
	28.5	68.2	97.4	41.2
cetona isobutil metílica	tiempo	e.e. del	e.e. del	conversión
	(h)	ácido	éster I	(%)
		(%)	(%)	(%)
	2	5.0	85.0	5.2
	7.5	5.3	95.0	5.6
	24	16.4	95.0	14.7

Los disolventes acetato de *tert*-butilo y especialmente el tolueno tienen un efecto positivo claro sobre la tasa de hidrólisis del éster I. Con tolueno, se obtiene el éster I con un 50.0% de conversión y un e.e. de un 99.2% después de 22 horas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Basilea Pharmaceutica AG

<120> Proceso para la producción de isavuconazol y ravuconazol

<130> WH/P41139EPPC

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 1650

< 212> ADN

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> SEQ ID N.º 2, variante del gen PLE, codón optimizado

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(1650)

< 223> variante de PLE

<400> 1

atg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga	48
Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg	
1 5 10 15	
gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct	96
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala	
20 25 30	
gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg	144
Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg	
35 40 45	
ttt gcc ccg ccg caa cca gca gag cca tgg tct ttc gtt aag aac act	192
Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr	
50 55 60	
act tcc tac cct cca atg tgt tgt caa gaa cca atc gga gga caa atg	240
Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met	
65 70 75 80	
ctt tca gac cta ttc act aac aga aag gaa agg ctt atc ccg gag ttc	288
Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe	
85 90 95	
tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg aca	336
Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr	
100 105 110	
aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga gga ggt ttg	384
Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu	
115 120 125	
gtt gtt gcc gga gca tcc act tat gac gga ttg gct ctt gcc gcg cac	432
Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His	
130 135 140	

ES 2 616 412 T3

gag aac gtt gtt gtt gtt gct att caa tac cgt ttg ggt att tgg gga Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly 145 150 155 160	480
ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat tta Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu 165 170 175	528
gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac ttc Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe 180 185 190	576
gga ggt gat cca ggt tct gtt act att ttc gga gaa tca gca ggc gga Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly 195 200 205	624
gag agt gtc tct gta ttg gtt tta tca cca tta gct aag aac ctt ttt Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe 210 215 220	672
cat cgt gct att tcc gaa agt ggt gtt gct ttt acc gcc ggt gtg gtc His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr Ala Gly Val Val 225 230 235 240	720
agg aag gat atg aag gcc gca gcc aag cag atc gct gtc ctt gca gga Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly 245 250 255	768
tgc aaa act act act tcg gca gtc ttc gtg cat tgt ttg cgt caa aag Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln Lys 260 265 270	816
tcg gaa gat gaa ctt tta gac ctc acg ttg aag atg aaa ttc ttt gcc Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Phe Ala 275 280 285	864
ctt gac tta cac gga gat cca agg gaa tct cac cct ttt ttg acc act Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Thr Thr 290 295 300	912
gtt gtt gac gga gtt ttg ttg cct aag atg cct gag gaa atc ttg gcc Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu Ala 305 310 315 320	960
gag aag gac ttt aac acc gtc cca tac att gtt gga att aac aag cag Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys Gln 325 330 335	1008
gag ttc gga tgg ctt ttg cca acg atg atg gga ttt cct ctt tcc gag Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu 340 345 350	1056
gga aag ttg gat caa aag acg gct acg tca ctt ttg tgg aag tcc tac Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr 355 360 365	1104
cca att gcc aac att cct gaa gag ttg acc cca gtt gct acc gat aag Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys 370 375 380	1152
tat tta gga gga aca gat gat cct gtc aaa aag aaa gat ttg ttt ttg Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu 385 390 395 400	1200

ES 2 616 412 T3

gat ctg atg gga gac gtt gtt ttc ggc gtc cca tca gtt acg gtt gct 1248
 Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala
 405 410 415

cgt cag cat agg gac gca gga gct cca act tac atg tat gag ttc caa 1296
 Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln
 420 425 430

tat cgt cca tct ttt tca tcg gat aag aaa cct aag acg gtt att gga 1344
 Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
 435 440 445

gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca ttg ctc aaa 1392
 Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys
 450 455 460

ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg aaa 1440
 Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys
 465 470 475 480

ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga ttg 1488
 Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
 485 490 495

cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att ggt 1536
 Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
 500 505 510

gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct ttt 1584
 Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe
 515 520 525

tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag ata 1632
 Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
 530 535 540

aag cac gcc gaa ttg taa 1650
 Lys His Ala Glu Leu
 545

<210> 2
 < 211> 549
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> Constructo sintético

<400> 2
 Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15

Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30

Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45

ES 2 616 412 T3

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

ES 2 616 412 T3

Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu Ala
305 310 315 320

Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys Gln
325 330 335

Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu
340 345 350

Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr
355 360 365

Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys
370 375 380

Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu
385 390 395 400

Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala
405 410 415

Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln
420 425 430

Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
435 440 445

Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys
450 455 460

Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys
465 470 475 480

Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
485 490 495

Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
500 505 510

Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe
515 520 525

Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
530 535 540

Lys His Ala Glu Leu

545

<210> 3
<211> 1650
<212> ADN
<213> secuencia artificial

ES 2 616 412 T3

<220>

< 223> SEQ ID N.º 4, gen APLE, codón optimizado

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(1650)

< 223> APLE

<400> 3

atg gga caa cca gct tgc ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga	48
Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg	
1 5 10 15	
gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct	96
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala	
20 25 30	
gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg	144
Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg	
35 40 45	
ttt gcc ccg ccg caa cca gca gag cca tgg tct ttc gtt aag aac act	192
Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr	
50 55 60	
act tcc tac cct cca atg tgt tgt caa gaa cca atc gga gga caa atg	240
Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met	
65 70 75 80	
ctt tca gac cta ttc act aac aga aag gaa agg ctt atc ccg gag ttc	288
Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe	
85 90 95	
tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg aca	336
Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr	
100 105 110	
aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga gga ggt ttg	384
Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu	
115 120 125	
gtt gtt ggc gga gca tcc act tat gac gga ttg gct ctt gcc gcg cac	432
Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His	
130 135 140	
gag aac gtt gtt gtt gtt gct att caa tac cgt ttg ggt att tgg gga	480
Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly	
145 150 155 160	
ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg gcc cat tta	528
Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu	
165 170 175	
gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac ttc	576

ES 2 616 412 T3

Asp	Gln	Val	Ala	Ala	Leu	His	Trp	Val	Gln	Glu	Asn	Ile	Ala	Asn	Phe		
			180					185					190				
gga	ggt	gat	cca	ggt	tct	gtt	act	att	ttc	gga	gaa	tca	gca	ggc	gga		624
Gly	Gly	Asp	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Ile	Phe	Gly	Glu	Ser	Ala	Gly	Gly		
		195					200					205					
gag	agt	gtc	tct	gta	ttg	gtt	tta	tca	cca	tta	gct	aag	aac	ctt	ttt		672
Glu	Ser	Val	Ser	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Pro	Leu	Ala	Lys	Asn	Leu	Phe		
	210					215					220						
cat	cgt	gct	att	tcc	gaa	agt	ggt	gtt	gct	ttt	acc	gcc	ggt	ttg	gtc		720
His	Arg	Ala	Ile	Ser	Glu	Ser	Gly	Val	Ala	Phe	Thr	Ala	Gly	Leu	Val		
225					230					235					240		
agg	aag	gat	atg	aag	gcc	gca	gcc	aag	cag	atc	gct	gtc	ctt	gca	gga		768
Arg	Lys	Asp	Met	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Gln	Ile	Ala	Val	Leu	Ala	Gly		
				245					250					255			
tgc	aaa	act	act	act	tcg	gca	gtc	ttc	gtg	cat	tgt	ttg	cgt	caa	aag		816
Cys	Lys	Thr	Thr	Thr	Ser	Ala	Val	Phe	Val	His	Cys	Leu	Arg	Gln	Lys		
				260				265						270			
tcg	gaa	gat	gaa	ctt	tta	gac	ctc	acg	ttg	aag	atg	aaa	ttc	ttt	gcc		864
Ser	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Asp	Leu	Thr	Leu	Lys	Met	Lys	Phe	Phe	Ala		
		275					280						285				
ctt	gac	tta	cac	gga	gat	cca	agg	gaa	tct	cac	cct	ttt	ttg	acc	act		912
Leu	Asp	Leu	His	Gly	Asp	Pro	Arg	Glu	Ser	His	Pro	Phe	Leu	Thr	Thr		
		290				295					300						
gtt	gtt	gac	gga	gtt	ttg	ttg	cct	aag	atg	cct	gag	gaa	atc	ttg	gcc		960
Val	Val	Asp	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Lys	Met	Pro	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala		
305					310						315				320		
gag	aag	gac	ttt	aac	acc	gtc	cca	tac	att	gtt	gga	att	aac	aag	cag		1008
Glu	Lys	Asp	Phe	Asn	Thr	Val	Pro	Tyr	Ile	Val	Gly	Ile	Asn	Lys	Gln		
				325					330					335			
gag	ttc	gga	tgg	ctt	ttg	cca	acg	atg	atg	gga	ttt	cct	ctt	tcc	gag		1056
Glu	Phe	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro	Thr	Met	Met	Gly	Phe	Pro	Leu	Ser	Glu		
			340					345						350			
gga	aag	ttg	gat	caa	aag	acg	gct	acg	tca	ctt	ttg	tgg	aag	tcc	tac		1104
Gly	Lys	Leu	Asp	Gln	Lys	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Trp	Lys	Ser	Tyr		
			355				360							365			
cca	att	gcc	aac	att	cct	gaa	gag	ttg	acc	cca	gtt	gct	acc	gat	aag		1152
Pro	Ile	Ala	Asn	Ile	Pro	Glu	Glu	Leu	Thr	Pro	Val	Ala	Thr	Asp	Lys		
			370				375					380					
tat	tta	gga	gga	aca	gat	gat	cct	gtc	aaa	aag	aaa	gat	ttg	ttt	ttg		1200
Tyr	Leu	Gly	Gly	Thr	Asp	Asp	Pro	Val	Lys	Lys	Lys	Asp	Leu	Phe	Leu		
385					390						395				400		
gat	ctg	atg	gga	gac	gtt	gtt	ttc	ggc	gtc	cca	tca	gtt	acg	gtt	gct		1248
Asp	Leu	Met	Gly	Asp	Val	Val	Phe	Gly	Val	Pro	Ser	Val	Thr	Val	Ala		
				405					410					415			
cg	cag	cat	agg	gac	gca	gga	gct	cca	act	tac	atg	tat	gag	ttc	caa		1296
Arg	Gln	His	Arg	Asp	Ala	Gly	Ala	Pro	Thr	Tyr	Met	Tyr	Glu	Phe	Gln		
			420					425						430			

ES 2 616 412 T3

tat cgt cca tct ttt tca tcg gat aag aaa cct aag acg gtt att gga 1344
 Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
 435 440 445

gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca ttg ctc aaa 1392
 Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys
 450 455 460

ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg aaa 1440
 Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys
 465 470 475 480

ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga ttg 1488
 Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
 485 490 495

cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att ggt 1536
 Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
 500 505 510

gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct ttt 1584
 Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe
 515 520 525

tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag ata 1632
 Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
 530 535 540

aag cac gcc gaa ttg taa 1650
 Lys His Ala Glu Leu
 545

<210> 4
 < 211> 549
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> Constructo sintético

<400> 4
 Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15

Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30

Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45

Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
 50 55 60

Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met
 65 70 75 80

ES 2 616 412 T3

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

ES 2 616 412 T3

Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu
340 345 350

Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr
355 360 365

Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys
370 375 380

Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu
385 390 395 400

Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala
405 410 415

Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln
420 425 430

Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
435 440 445

Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys
450 455 460

Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys
465 470 475 480

Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
485 490 495

Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
500 505 510

Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe
515 520 525

Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
530 535 540

Lys His Ala Glu Leu
545

<210> 5
< 211> 1650
< 212> ADN
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> SEQ ID N.º 6, híbrido 3 del gen APLE, codón optimizado

<220>
< 221> CDS
< 222> (1)..(1650)
< 223> Híbrido 3 de APLE

ES 2 616 412 T3

<400> 5
atg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga 48
Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
1 5 10 15

gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct 96
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
20 25 30

gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg 144
Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
35 40 45

ttt gcc ccg ccg caa cca gca gag cca tgg tct ttc gtt aag aac act 192
Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
50 55 60

act tcc tac cct cca atg tgt tgt caa gaa cca atc gga gga caa atg 240
Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met
65 70 75 80

ctt tca gac cta ttc act aac aga aag gaa agg ctt atc ccg gag ttc 288
Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe
85 90 95

tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg aca 336
Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr
100 105 110

aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga gga ggt ttg 384
Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu
115 120 125

gtt gtt ggc gga gca tcc act tat gac gga ttg gct ctt gcc gcg cac 432
Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His
130 135 140

gag aac gtt gtt gtt gtt gct att caa tac cgt ttg ggt att tgg gga 480
Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly
145 150 155 160

ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat tta 528
Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu
165 170 175

gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac ttc 576
Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe
180 185 190

gga ggt gat cca ggt tct gtt act att ttc gga gaa tca gca ggc gga 624
Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly
195 200 205

gag agt gtc tct gta ttg gtt tta tca cca tta gct aag aac ctt ttt 672
Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe

ES 2 616 412 T3

210	215	220	
cat cgt gct att tcc gaa agt ggt gtt gct tta acc gtc gct ttg gtc His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Leu Thr Val Ala Leu Val 225 230 235 240			720
agg aag gat atg aag gcc gca gcc aag cag atc gct gtc ctt gca gga Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly 245 250 255			768
tgc aaa act act act tcg gca gtc ttc gtg cat tgt ttg cgt caa aag Cys Lys Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln Lys 260 265 270			816
tcg gaa gat gaa ctt tta gac ctc acg ttg aag atg aaa ttc ttt gcc Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Thr Thr 275 280 285			864
ctt gac tta cac gga gat cca agg gaa tct cac cct ttt ttg acc act Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Thr Thr 290 295 300			912
gtt gtt gac gga gtt ttg ttg cct aag atg cct gag gaa atc ttg gcc Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu Ala 305 310 315 320			960
gag aag gac ttt aac acc gtc cca tac att gtt gga att aac aag cag Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys Gln 325 330 335			1008
gag ttc gga tgg ctt ttg cca acg atg atg gga ttt cct ctt tcc gag Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu 340 345 350			1056
gga aag ttg gat caa aag acg gct acg tca ctt ttg tgg aag tcc tac Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr 355 360 365			1104
cca att gcc aac att cct gaa gag ttg acc cca gtt gct acc gat aag Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys 370 375 380			1152
tat tta gga gga aca gat gat cct gtc aaa aag aaa gat ttg ttt ttg Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu 385 390 395 400			1200
gat ctg atg gga gac gtt gtt ttc ggc gtc cca tca gtt acg gtt gct Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala 405 410 415			1248
cgt cag cat agg gac gca gga gct cca act tac atg tat gag ttc caa Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln 420 425 430			1296
tat cgt cca tct ttt tca tcg gat aag aaa cct aag acg gtt att gga Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly 435 440 445			1344
gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca ttg ctc aaa Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys 450 455 460			1392
ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg aaa			1440

ES 2 616 412 T3

Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys
 465 470 475 480

ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga ttg 1488
 Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
 485 490 495

cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att ggt 1536
 Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
 500 505 510

gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct ttt 1584
 Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe
 515 520 525

tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag ata 1632
 Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
 530 535 540

aag cac gcc gaa ttg taa 1650
 Lys His Ala Glu Leu
 545

<210> 6
 < 211> 549
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> Constructo sintético

<400> 6
 Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15

Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30

Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45

Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
 50 55 60

Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met
 65 70 75 80

Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe
 85 90 95

Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr
 100 105 110

Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu

ES 2 616 412 T3

	115						120							125	
Val	Val	Gly	Gly	Ala	Ser	Thr	Tyr	Asp	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	His
	130						135						140		
Glu	Asn	Val	Val	Val	Val	Ala	Ile	Gln	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ile	Trp	Gly
145						150				155					160
Phe	Phe	Ser	Thr	Gly	Asp	Glu	His	Ser	Arg	Gly	Asn	Trp	Gly	His	Leu
				165					170					175	
Asp	Gln	Val	Ala	Ala	Leu	His	Trp	Val	Gln	Glu	Asn	Ile	Ala	Asn	Phe
			180					185					190		
Gly	Gly	Asp	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Ile	Phe	Gly	Glu	Ser	Ala	Gly	Gly
		195					200						205		
Glu	Ser	Val	Ser	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Pro	Leu	Ala	Lys	Asn	Leu	Phe
	210						215					220			
His	Arg	Ala	Ile	Ser	Glu	Ser	Gly	Val	Ala	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	Val
225					230					235					240
Arg	Lys	Asp	Met	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Gln	Ile	Ala	Val	Leu	Ala	Gly
				245					250					255	
Cys	Lys	Thr	Thr	Thr	Ser	Ala	Val	Phe	Val	His	Cys	Leu	Arg	Gln	Lys
			260					265					270		
Ser	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Asp	Leu	Thr	Leu	Lys	Met	Lys	Phe	Phe	Ala
		275					280					285			
Leu	Asp	Leu	His	Gly	Asp	Pro	Arg	Glu	Ser	His	Pro	Phe	Leu	Thr	Thr
	290					295					300				
Val	Val	Asp	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Lys	Met	Pro	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala
305					310					315					320
Glu	Lys	Asp	Phe	Asn	Thr	Val	Pro	Tyr	Ile	Val	Gly	Ile	Asn	Lys	Gln
				325					330					335	
Glu	Phe	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro	Thr	Met	Met	Gly	Phe	Pro	Leu	Ser	Glu
			340					345					350		
Gly	Lys	Leu	Asp	Gln	Lys	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Trp	Lys	Ser	Tyr
		355					360					365			

ES 2 616 412 T3

Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys
370 375 380

Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu
385 390 395 400

Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala
405 410 415

Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln
420 425 430

Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
435 440 445

Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys
450 455 460

Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys
465 470 475 480

Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
485 490 495

Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
500 505 510

Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe
515 520 525

Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
530 535 540

Lys His Ala Glu Leu
545

<210> 7
< 211> 1650
< 212> ADN
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> SEQ ID N.º 8, híbrido 1 del gen APLE

<220>
< 221> CDS
< 222> (1)..(1650)
< 223> Híbrido 1 de APLE

ES 2 616 412 T3

<400> 7
atg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga 48
Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
1 5 10 15
gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct 96
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
20 25 30
gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg 144
Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
35 40 45
ttt gcc ccg ccg caa cca gca gag cca tgg tct ttc gtt aag aac act 192
Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
50 55 60
act tcc tac cct cca atg tgt tgt caa gat cca gtc gta gaa caa atg 240
Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val Val Glu Gln Met
65 70 75 80
acg tca gac cta ttc act aac gga aag gaa agg ctt acc ctg gag ttc 288
Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu Thr Leu Glu Phe
85 90 95
tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg aca 336
Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr
100 105 110
aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga gga ggt ttg 384
Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu
115 120 125
gtt gtt ggc gga gca tcc act tat gac gga ttg gct ctt gcc gcg cac 432
Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His
130 135 140
gag aac gtt gtt gtt gtt gct att caa tac cgt ttg ggt att tgg gga 480
Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly
145 150 155 160
ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat tta 528
Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu
165 170 175
gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac ttc 576
Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe
180 185 190
gga ggt gat cca ggt tct gtt act att ttc gga gaa tca gca ggc gga 624
Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly
195 200 205
gag agt gtc tct gta ttg gtt tta tca cca tta gct aag aac ctt ttt 672
Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe
210 215 220
cat cgt gct att tcc gaa agt ggt gtt gct ttt acc gcc ggt ttg gtc 720
His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr Ala Gly Leu Val
225 230 235 240
agg aag gat atg aag gcc gca gcc aag cag atc gct gtc ctt gca gga 768
Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly
245 250 255

ES 2 616 412 T3

tgc aaa act act act tcg gca gtc ttc gtg cat tgt ttg cgt caa aag Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln Lys 260 265 270	816
tcg gaa gat gaa ctt tta gac ctc acg ttg aag atg aaa ttc ttt gcc Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Phe Ala 275 280 285	864
ctt gac tta cac gga gat cca agg gaa tct cac cct ttt ttg acc act Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Thr Thr 290 295 300	912
gtt gtt gac gga gtt ttg ttg cct aag atg cct gag gaa atc ttg gcc Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu Ala 305 310 315 320	960
gag aag gac ttt aac acc gtc cca tac att gtt gga att aac aag cag Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys Gln 325 330 335	1008
gag ttc gga tgg ctt ttg cca acg atg atg gga ttt cct ctt tcc gag Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu 340 345 350	1056
gga aag ttg gat caa aag acg gct acg tca ctt ttg tgg aag tcc tac Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr 355 360 365	1104
cca att gcc aac att cct gaa gag ttg acc cca gtt gct acc gat aag Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys 370 375 380	1152
tat tta gga gga aca gat gat cct gtc aaa aag aaa gat ttg ttt ttg Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu 385 390 395 400	1200
gat ctg atg gga gac gtt gtt ttc ggc gtc cca tca gtt acg gtt gct Asp Leu Met Gly Asp Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala 405 410 415	1248
cgt cag cat agg gac gca gga gct cca act tac atg tat gag ttc caa Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln 420 425 430	1296
tat cgt cca tct ttt tca tcg gat aag aaa cct aag acg gtt att gga Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly 435 440 445	1344
gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca ttg ctc aaa Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys 450 455 460	1392
ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg aaa Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys 465 470 475 480	1440
ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga ttg Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu 485 490 495	1488
cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att ggt Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly	1536

ES 2 616 412 T3

	500	505	510	
gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct ttt				1584
Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe	515	520	525	
tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag ata				1632
Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile	530	535	540	
aag cac gcc gaa ttg taa				1650
Lys His Ala Glu Leu				
545				
<210> 8				
< 211> 549				
< 212> PRT				
< 213> secuencia artificial				
<220>				
< 223> Constructo sintético				
<400> 8				
Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg				
1	5		10	15
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala				
	20		25	30
Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg				
	35		40	45
Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr				
	50		55	60
Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val Val Glu Gln Met				
	65		70	75
Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu Thr Leu Glu Phe				
	85		90	95
Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr				
	100		105	110
Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu				
	115		120	125
Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His				
	130		135	140
Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly				
	145		150	155
				160

ES 2 616 412 T3

Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu
 165 170 175
 Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe
 180 185 190
 Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly
 195 200 205
 Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe
 210 215 220
 His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr Ala Gly Leu Val
 225 230 235 240
 Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly
 245 250 255
 Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln Lys
 260 265 270
 Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Phe Ala
 275 280 285
 Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Thr Thr
 290 295 300
 Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu Ala
 305 310 315 320
 Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys Gln
 325 330 335
 Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu
 340 345 350
 Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr
 355 360 365
 Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys
 370 375 380
 Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu
 385 390 395 400
 Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala

ES 2 616 412 T3

405 410 415

Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln
420 425 430

Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
435 440 445

Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys
450 455 460

Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys
465 470 475 480

Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
485 490 495

Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
500 505 510

Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe
515 520 525

Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
530 535 540

Lys His Ala Glu Leu
545

<210> 9
 < 211> 1650
 < 212> ADN
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> SEQ ID N.º 10, variante del gen PLE, codon optimizado

<220>
 < 221> CDS
 < 222> (1)..(1650)
 < 223> variante de PLE

<400> 9

atg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga	48
Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg	
1 5 10 15	
gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct	96
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala	
20 25 30	
gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg	144

ES 2 616 412 T3

Val	Phe	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Ala	Lys	Pro	Pro	Leu	Gly	Ser	Leu	Arg		
		35					40					45					
ttt	gcc	ccg	ccg	caa	cca	gca	gag	cca	tgg	tct	ttc	gtt	aag	aac	act		192
Phe	Ala	Pro	Pro	Gln	Pro	Ala	Glu	Pro	Trp	Ser	Phe	Val	Lys	Asn	Thr		
	50					55					60						
act	tcc	tac	cct	cca	atg	tgt	tgt	caa	gaa	cca	atc	gga	gga	caa	atg		240
Thr	Ser	Tyr	Pro	Pro	Met	Cys	Cys	Gln	Glu	Pro	Ile	Gly	Gly	Gln	Met		
65					70					75					80		
ctt	tca	gac	cta	ttc	act	aac	aga	aag	gaa	agg	ctt	atc	ccg	gag	ttc		288
Leu	Ser	Asp	Leu	Phe	Thr	Asn	Arg	Lys	Glu	Arg	Leu	Ile	Pro	Glu	Phe		
				85					90					95			
tct	gag	gat	tgc	ctt	tac	cta	aat	att	tac	act	cct	gcc	gat	ttg	aca		336
Ser	Glu	Asp	Cys	Leu	Tyr	Leu	Asn	Ile	Tyr	Thr	Pro	Ala	Asp	Leu	Thr		
			100					105					110				
aag	agg	ggt	agg	ttg	ccg	gtt	atg	gtt	tgg	att	cat	gga	gga	ggt	ttg		384
Lys	Arg	Gly	Arg	Leu	Pro	Val	Met	Val	Trp	Ile	His	Gly	Gly	Gly	Leu		
		115					120					125					
gtt	gtt	ggc	gga	gca	tcc	act	tat	gac	gga	ttg	gct	ctt	gcc	gcg	cac		432
Val	Val	Gly	Gly	Ala	Ser	Thr	Tyr	Asp	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	His		
		130				135					140						
gag	aac	gtt	gtt	gtt	gtt	gct	att	caa	tac	cgt	ttg	ggt	att	tgg	gga		480
Glu	Asn	Val	Val	Val	Val	Ala	Ile	Gln	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ile	Trp	Gly		
145					150					155					160		
ttt	ttc	tcc	aca	gga	gat	gag	cat	tcc	cgt	gga	aac	tgg	ggc	cat	tta		528
Phe	Phe	Ser	Thr	Gly	Asp	Glu	His	Ser	Arg	Gly	Asn	Trp	Gly	His	Leu		
				165					170					175			
gat	caa	gtt	gct	gca	ttg	cat	tgg	gtc	caa	gaa	aac	att	gct	aac	ttc		576
Asp	Gln	Val	Ala	Ala	Leu	His	Trp	Val	Gln	Glu	Asn	Ile	Ala	Asn	Phe		
			180					185					190				
gga	ggt	gat	cca	ggt	tct	gtt	act	att	ttc	gga	gaa	tca	gca	ggc	gga		624
Gly	Gly	Asp	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Ile	Phe	Gly	Glu	Ser	Ala	Gly	Gly		
		195				200						205					
gag	agt	gtc	tct	gta	ttg	gtt	tta	tca	cca	tta	gct	aag	aac	ctt	ttt		672
Glu	Ser	Val	Ser	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Pro	Leu	Ala	Lys	Asn	Leu	Phe		
		210				215					220						
cat	cgt	gct	att	tcc	gaa	agt	ggt	gtt	gct	ttt	acc	gcc	ggt	ttg	gtc		720
His	Arg	Ala	Ile	Ser	Glu	Ser	Gly	Val	Ala	Phe	Thr	Ala	Gly	Leu	Val		
225					230					235				240			
agg	aag	gat	atg	aag	gcc	gca	gcc	aag	cag	atc	gct	gtc	ctt	gca	gga		768
Arg	Lys	Asp	Met	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Gln	Ile	Ala	Val	Leu	Ala	Gly		
				245					250					255			
tgc	aaa	act	act	act	tcg	gca	gac	ttc	gtg	cat	tgt	ttg	cgt	caa	aag		816
Cys	Lys	Thr	Thr	Thr	Ser	Ala	Asp	Phe	Val	His	Cys	Leu	Arg	Gln	Lys		
				260				265						270			
tcg	gaa	gat	gaa	ctt	tta	gac	ctc	acg	ttg	aag	atg	aaa	ttc	ttt	gcc		864
Ser	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Asp	Leu	Thr	Leu	Lys	Met	Lys	Phe	Phe	Ala		
		275					280						285				

ES 2 616 412 T3

ctt gac tta cac gga gat cca agg gaa tct cac cct ttt ttg acc act 912
 Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Thr Thr
 290 295 300

 gtt gtt gac gga gtt ttg ttg cct aag atg cct gag gaa atc ttg gcc 960
 Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu Ala
 305 310 315 320

 gag aag gac ttt aac acc gtc cca tac att gtt gga att aac aag cag 1008
 Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys Gln
 325 330 335

 gag ttc gga tgg ctt ttg cca acg atg atg gga ttt cct ctt tcc gag 1056
 Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu
 340 345 350

 gga aag ttg gat caa aag acg gct acg tca ctt ttg tgg aag tcc tac 1104
 Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr
 355 360 365

 cca att gcc aac att cct gaa gag ttg acc cca gtt gct acc gat aag 1152
 Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys
 370 375 380

 tat tta gga gga aca gat gat cct gtc aaa aag aaa gat ttg ttt ttg 1200
 Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu
 385 390 395 400

 gat ctg atg gga gac gtt gtt ttc ggc gtc cca tca gtt acg gtt gct 1248
 Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala
 405 410 415

 cgt cag cat agg gac gca gga gct cca act tac atg tat gag ttc caa 1296
 Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln
 420 425 430

 tat cgt cca tct ttt tca tcg gat aag aaa cct aag acg gtt att gga 1344
 Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
 435 440 445

 gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca ttg ctc aaa 1392
 Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys
 450 455 460

 ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg aaa 1440
 Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys
 465 470 475 480

 ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga ttg 1488
 Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
 485 490 495

 cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att ggt 1536
 Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
 500 505 510

 gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct ttt 1584
 Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe
 515 520 525

 tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag ata 1632
 Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
 530 535 540

 aag cac gcc gaa ttg taa 1650
 Lys His Ala Glu Leu
 545

<210> 10
 <211> 549
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

ES 2 616 412 T3

<220>

< 223> Constructo sintético

<400> 10

Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
1 5 10 15

Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
20 25 30

Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
35 40 45

Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
50 55 60

Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met
65 70 75 80

Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe
85 90 95

Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr
100 105 110

Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu
115 120 125

Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His
130 135 140

Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly
145 150 155 160

Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu
165 170 175

Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe
180 185 190

ES 2 616 412 T3

Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly
 195 200 205

Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe
 210 215 220

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

Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly
 245 250 255

Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Asp Phe Val His Cys Leu Arg Gln Lys
 260 265 270

Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Phe Ala
 275 280 285

Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Thr Thr
 290 295 300

Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu Ala
 305 310 315 320

Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys Gln
 325 330 335

Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu
 340 345 350

Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr
 355 360 365

Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys
 370 375 380

Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu
 385 390 395 400

Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala
 405 410 415

Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln
 420 425 430

Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
 435 440 445

ES 2 616 412 T3

Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys
450 455 460

Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys
465 470 475 480

Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
485 490 495

Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
500 505 510

Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe
515 520 525

Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
530 535 540

Lys His Ala Glu Leu
545

<210> 11
<211> 1650
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> SEQ ID N.º 12, híbrido 4 del gen APLE, codón optimizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1650)
<223> Híbrido 4 de APLE

<400> 11
atg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga 48
Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
1 5 10 15
gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct 96
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
20 25 30
gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg 144
Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
35 40 45
ttt gcc ccg ccg caa cca gca gag cca tgg tct ttc gtt aag aac act 192
Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
50 55 60
act tcc tac cct cca atg tgt tgt caa gaa cca atc gga gga caa atg 240
Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met

ES 2 616 412 T3

65	70	75	80	
ctt tca gac cta ttc act aac aga aag gaa agg ctt atc ccg gag ttc Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe 85 90 95				288
tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg aca Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr 100 105 110				336
aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga gga ggt ttg Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Leu 115 120 125				384
ggt gtt ggc gga gca tcc act tat gac gga ttg gct ctt gcc gcg cac Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His 130 135 140				432
gag aac gtt gtt gtt gtt gct att caa tac cgt ttg ggt att tgg gga Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly 145 150 155 160				480
ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat tta Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu 165 170 175				528
gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac ttc Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe 180 185 190				576
gga ggt gat cca ggt tct gtt act att ttc gga gaa tca gca ggc gga Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly 195 200 205				624
gag agt gtc tct gta ttg gtt tta tca cca tta gct aag aac ctt ttt Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe 210 215 220				672
cat cgt gct att tcc gaa agt ggt gtt gct ttt acc gcc ggt ttg gtc His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr Ala Gly Leu Val 225 230 235 240				720
agg aag gat atg aag gcc gca gcc aag cag atc gct gtc ctt gca gga Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly 245 250 255				768
tgc aaa act act act tcg gca gtc ttc gtg cat tgt ttg cgt caa aag Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln Lys 260 265 270				816
tcg gaa gat gaa ctt tta gac ctc acg ttg aag atg aaa ttc ctg acc Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Leu Thr 275 280 285				864
ctt gac ttt cac gga gat caa agg gaa tct cac cct ttt ttg ccg act Leu Asp Phe His Gly Asp Gln Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Pro Thr 290 295 300				912
gtt gtt gac gga gtt ttg ttg cct aag atg cct gag gaa atc ttg gcc Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu Ala 305 310 315 320				960
gag aag gac ttt aac acc gtc cca tac att gtt gga att aac aag cag				1008

ES 2 616 412 T3

Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys Gln	
	325
	330
	335
gag ttc gga tgg ctt ttg cca acg atg atg gga ttt cct ctt tcc gag	1056
Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu	
	340
	345
	350
gga aag ttg gat caa aag acg gct acg tca ctt ttg tgg aag tcc tac	1104
Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr	
	355
	360
	365
cca att gcc aac att cct gaa gag ttg acc cca gtt gct acc gat aag	1152
Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys	
	370
	375
	380
tat tta gga gga aca gat gat cct gtc aaa aag aaa gat ttg ttt ttg	1200
Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu	
	385
	390
	395
	400
gat ctg atg gga gac gtt gtt ttc ggc gtc cca tca gtt acg gtt gct	1248
Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala	
	405
	410
	415
cgt cag cat agg gac gca gga gct cca act tac atg tat gag ttc caa	1296
Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln	
	420
	425
	430
tat cgt cca tct ttt tca tca gat aag aaa cct aag acg gtt att gga	1344
Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly	
	435
	440
	445
gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca ttg ctg aaa	1392
Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys	
	450
	455
	460
ggc gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg aaa	1440
Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys	
	465
	470
	475
	480
ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga ttg	1488
Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu	
	485
	490
	495
cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att ggt	1536
Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly	
	500
	505
	510
gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct ttt	1584
Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe	
	515
	520
	525
tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag ata	1632
Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile	
	530
	535
	540
aag cac gcc gaa ttg taa	1650
Lys His Ala Glu Leu	
	545

<210> 12

< 211> 549

< 212> PRT

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> Constructo sintético

ES 2 616 412 T3

<400> 12

Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15

Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30

Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45

Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
 50 55 60

Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met
 65 70 75 80

Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe
 85 90 95

Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr
 100 105 110

Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu
 115 120 125

Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His
 130 135 140

Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly
 145 150 155 160

Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu
 165 170 175

Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe
 180 185 190

Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly
 195 200 205

Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe
 210 215 220

ES 2 616 412 T3

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

Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly
 245 250 255

Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln Lys
 260 265 270

Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Leu Thr
 275 280 285

Leu Asp Phe His Gly Asp Gln Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Pro Thr
 290 295 300

Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu Ala
 305 310 315 320

Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys Gln
 325 330 335

Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu
 340 345 350

Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr
 355 360 365

Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys
 370 375 380

Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu
 385 390 395 400

Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala
 405 410 415

Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln
 420 425 430

Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
 435 440 445

Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys
 450 455 460

Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys
 465 470 475 480

ES 2 616 412 T3

Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
485 490 495

Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
500 505 510

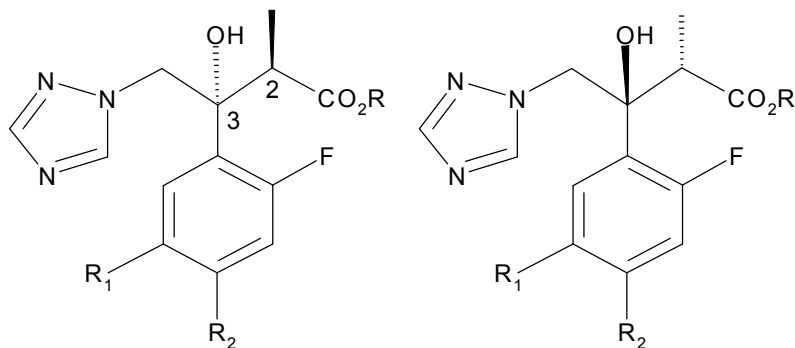
Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe
515 520 525

Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
530 535 540

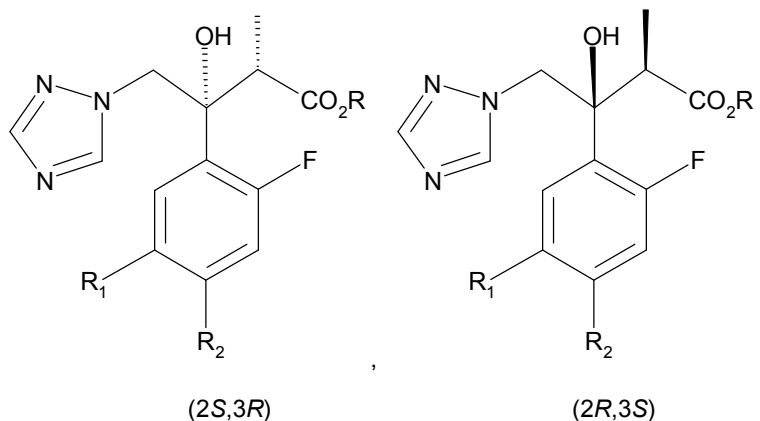
Lys His Ala Glu Leu
545

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de una mezcla de diastereómeros de un derivado de tipo éster del ácido 3-hidroxi-2-metil-4-[1,2,4]triazol-1-il-3-fenilbutírico de acuerdo con la fórmula (I):



5 (2*R*,3*R*) (I) (2*S*,3*S*) ;



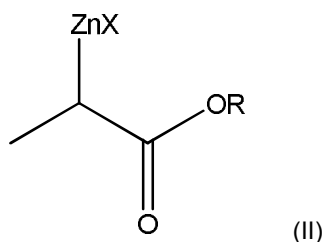
(2*S*,3*R*) (2*R*,3*S*) ;

que está enriquecida en el racemato (2*R*,3*R*)/(2*S*,3*S*) correspondiente, y

10 donde R₁ y R₂ son cada uno flúor o hidrógeno y cuando R₁ es flúor, R₂ es hidrógeno y cuando R₂ es flúor, R₁ es hidrógeno, donde R es un alquilo C₁-C₁₂, un arilo C₅-C₁₂ o un aralquilo C₆-C₁₁,

que comprende los siguientes pasos:

(i) preparación de un éster 2-halozincpropionato de acuerdo con la fórmula (II)

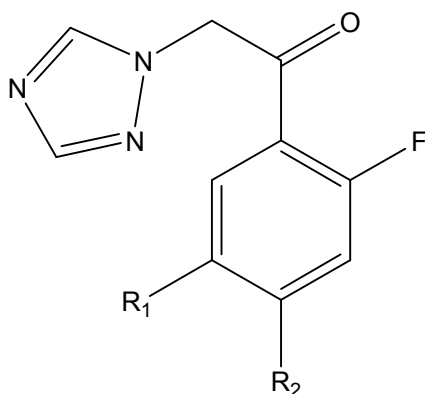


donde X es bromo, yodo o cloro,

15 en presencia de un disolvente,

a una temperatura por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente,

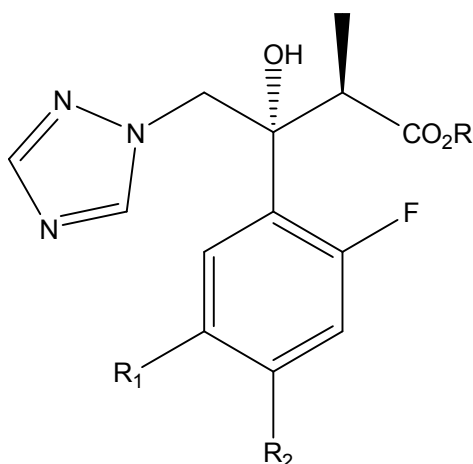
(ii) introducción de una cetona de acuerdo con la fórmula (III)



(iii) llevar a cabo una reacción de Reformatsky entre el éster 2-halozincpropionato de acuerdo con la fórmula (II) y la cetona de acuerdo con la fórmula (III),

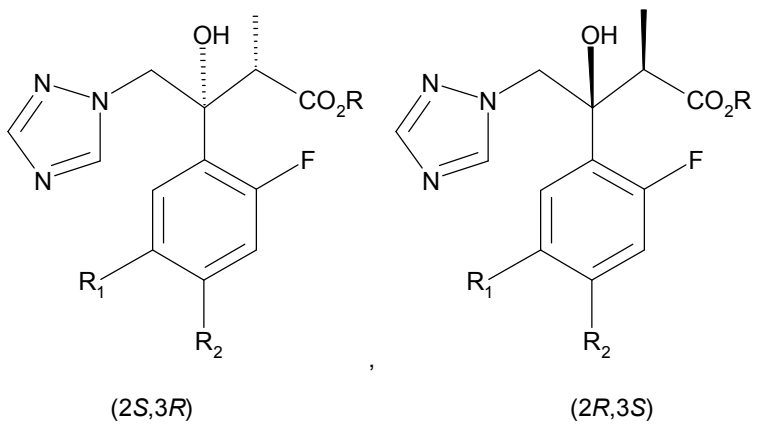
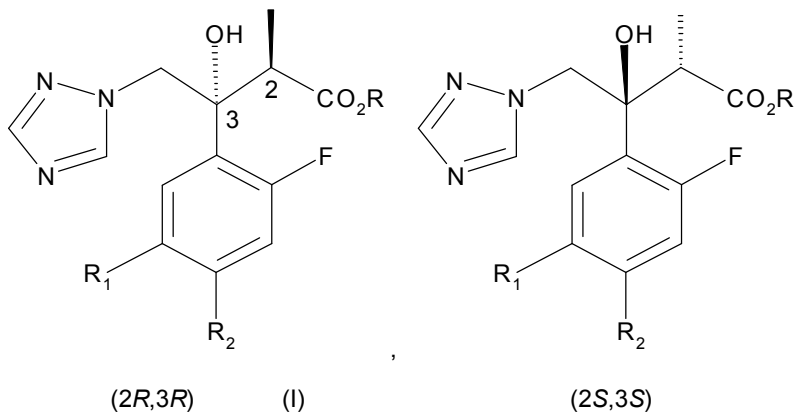
en presencia de un disolvente,

- 5 permitir que la mezcla de reacción resultante forme un precipitado dejando la mezcla, con o sin agitación, durante más de 0.5 horas, preferentemente durante más de 2 horas, después de la adición del último reactivo a la mezcla, donde el precipitado está enriquecido en el (2*R*,3*R*)/(2*S*,3*S*)-éster racémico de acuerdo con la fórmula (I), y
- separar dicho precipitado,
- 10 donde la secuencia en la que se llevan a cabo los pasos (i) y (ii) se puede intercambiar y donde el exceso de zinc se elimina antes de la formación de dicha precipitación.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde R₁ en la fórmula (I) es flúor y R₂ es hidrógeno.
 3. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde R en la fórmula (II) es etilo y/o X en la fórmula (II) es bromo.
 4. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la temperatura en el paso (i) está comprendida entre -10 °C y 40 °C.
 - 15 5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4, donde la temperatura está comprendida entre -10 °C y 10 °C.
 6. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la temperatura en el paso (iii) está por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente.
 - 20 7. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el paso (i) se realiza antes que el paso (ii).
 8. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el disolvente en el paso (i) y/o el paso (iii) es un disolvente aprótico polar.
 9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, donde el disolvente es tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, éter *tert*-butil metílico, éter diisopropílico, éter dietílico, acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano o tolueno.
 - 25 10. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el éster 2-halozincpropionato del paso (i) se obtiene mediante la reacción de un éster 2-halopropionato con zinc metálico.
 11. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que está seguido por
 - 30 (iv) la disolución y/o extracción del precipitado obtenido en el paso (iii) en un disolvente orgánico y la resolución de los diastereómeros (2*R*,3*R*)/(2*S*,3*S*) en dicha solución para obtener un producto enriquecido en el enantiómero (2*R*,3*R*) deseado del éster de fórmula (I):



(*R,R*-éster I).

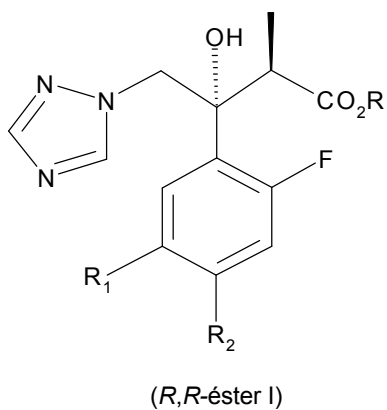
12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, donde se lleva a cabo una resolución enzimática del diastereómero del éster de acuerdo con la fórmula (I) utilizando una enzima esterasa.
- 5 13. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicha enzima esterasa es un polipéptido aislado con actividad esterasa que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N.º 4 o un homólogo de esta que tiene una identidad de aminoácidos de al menos un 95%, preferentemente de al menos un 98%.
14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicha enzima esterasa es un polipéptido aislado con actividad esterasa que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N.º 2 o un homólogo de esta que tiene una identidad de aminoácidos de al menos un 95%, donde dicho homólogo contiene valina como aminoácido en la posición 239 o la posición correspondiente a ella. .
- 10 15. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 14, donde dichos homólogos tienen una identidad de aminoácidos de al menos un 98%, preferentemente de al menos un 99%, y contienen valina como aminoácido en la posición 239 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N.º 2 o la posición de la secuencia del homólogo correspondiente a ella.
- 15 16. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, donde el polipéptido aislado con actividad esterasa comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N.º 2.
17. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16, donde el polipéptido aislado con actividad esterasa comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N.º 2.
- 20 18. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-17, donde se utiliza un codisolvente orgánico en la resolución enzimática seleccionado entre *tert*-butanol, acetato de *tert*-butilo, cetona isobutil metílica y tolueno.
19. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-18, seguido por la conversión del producto enriquecido en el enantiómero (*2R,3R*) deseado del éster de fórmula (I) obtenido en el paso (iv) en la correspondiente amida mediante un tratamiento con amoníaco.
- 25 20. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 19, seguido por la deshidratación de la amida en el cianuro correspondiente.
21. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 20, seguido por la conversión del cianuro en la tioamida correspondiente y, opcionalmente, la conversión adicional de dicha tioamida en isavuconazol, cuando el resto fenilo de dicha tioamida tiene una sustitución de tipo 2,5-difluoro, o ravuconazol, cuando el resto fenilo de dicha tioamida tiene una sustitución de tipo 2,4-difluoro, mediante la reacción con un reactivo que es una 4-cianoacetofenona que tiene una sustitución de tipo alfa-ceto.
- 30 22. Una mezcla de diastereómeros del éster del ácido 3-hidroxi-2-metil-4-[1,2,4]triazol-1-il-3-fenilbutírico de fórmula (I):



5

que comprende la mezcla racémica de los ésteres (*2R,3R*)/(*2S,3S*) con un exceso diastereómero, según se determina por GC, comprendido entre un 97% y un 99.9%, preferentemente comprendido entre un 99% y un 99.9%, donde R_1 y R_2 son cada uno flúor o hidrógeno y cuando R_1 es flúor, R_2 es hidrógeno y cuando R_2 es flúor, R_1 es hidrógeno, donde R es un alquilo C_1 - C_{12} , o arilo C_5 - C_{12} o un aralquilo C_6 - C_{11} .

10 23. Un derivado de tipo éster del ácido (*2R,3R*)-3-hidroxi-2-metil-4-[1,2,4]triazol-1-il-3-fenilbutírico de fórmula (I):



donde

R es un alquilo C_1 - C_{12} o arilo C_5 - C_{12} ,

15 R_1 es flúor y

R_2 es hidrógeno.