

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 619 338**

(51) Int. Cl.:

C12P 17/12 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C07D 211/42 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2012 PCT/IB2012/001178**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO2013190341**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2012 E 12735330 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2861750**

(54) Título: **Procedimiento para la producción de 3-piperidinoles quirales sustituidos en posición 1 empleando oxidorreductasas**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2017

(73) Titular/es:

OLON S.P.A. (100.0%)
Strada Rivoltana km. 6/7
20090 Rodano (MI), IT

(72) Inventor/es:

**BERTOLINI, GIORGIO y
MAGRI', PAOLO**

(74) Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 619 338 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de 3-piperidinoles quirales sustituidos en posición 1 empleando oxidorreductasas

Sumario de la invención

La presente invención versa sobre un procedimiento enzimático enantioselectivo para la preparación de un derivado ópticamente activo del ácido 3-hidroxipiperidincarboxílico.

5 Antecedentes técnicos

Algunos ésteres ópticamente activos de 3-hidroxipiperidincarboxilato son compuestos intermedios útiles en la síntesis de agentes farmacéuticos de interés.

10 En general, pueden obtenerse compuestos ópticamente activos de hidroxilo mediante resolución del correspondiente racemato mediante procedimientos químicos o enzimáticos conocidos. Estas resoluciones tienen muchos inconvenientes, tales como, por ejemplo, la producción del enantiómero deseado que, por supuesto, no puede ser más del 50% del compuesto del racemato de partida.

15 Lacheretz, R. y otros: "Daucus carota mediated-reduction of cyclic 3-oxo-amines", Organic Letters, vol. 11, nº 6, 2009, páginas 1245-1248, enseña que la zanahoria contiene reductasas y, por esta razón, las zanahorias fueron seleccionadas para reducir piperidininas para lograr "buenos resultados" (página 1246, columna derecha, primer párrafo). Ciertamente, este documento da a conocer la preparación del alcohol haciendo reaccionar 2 mmol (aprox. 0,5 g) de un cetocompuesto con 140 g de zanahorias, en 600 ml de agua, es decir, una proporción en peso de "compuesto de partida"/"catalizador" igual a 1/280, lo cual no es un proceso industrial practicable. Van Luppen, J.J. y otros: "Enzymatic in vitro reduction of ketones. part 13. hlad-catalyzed reduction of 3-piperidone derivatives to piperidinols with high enantiomeric purity", Studies in Organic Chemistry (Bio-Organic Heterocycles), vol. 18, 1984, páginas 277-280, da a conocer la reducción de 3-piperidinonas usando HLAD como catalizador, en presencia de NAD y etanol, pero los procedimientos que han de aplicarse no son muy practicables y los resultados no son muy prometedores.

20 Kizaki, N. Y OTROS: "Characterization of novel alcohol dehydrogenase of Devosia riboflavina involved in stereoselective reduction of 3-pyrrolidinone derivatives", Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic, vol. 51, nº 3-4, 9 de noviembre de 2007 (2007-11-09), páginas 73-80, da a conocer la preparación de un (R)-pirrolidinol usando una alcohol deshidrogenasa; es decir, un proceso que produce el diastereoisómero opuesto en vez del deseado. También este documento habría alejado al experto del uso de oxidorreductasas para reducir piperidonas.

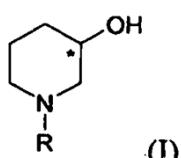
Objetos de la invención

25 Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para la preparación de un derivado ópticamente activo de 3-hidroxipiperidincarboxilato que es simple, seguro y rentable.

Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de un derivado ópticamente activo de 3-hidroxipiperidincarboxilato mediante reducción enzimática de los correspondientes oxoderivados.

Descripción de la invención

30 Así, según uno de sus aspectos, la presente invención versa sobre un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I)



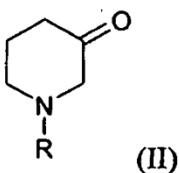
en la que el carbono quiral está en la configuración (S);

R se selecciona entre hidrógeno y COR₁;

40 R₁ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆ y OR₂;

R₂ se selecciona entre alquilo C₁-C₆ y bencilo, estando dicho bencilo opcionalmente sustituido por uno o más grupos alquilo C₁-C₆;

que comprende reducir un compuesto de fórmula (II)



en la que R se define como anteriormente, con una oxidorreductasa de ID SEC. N° 1 en presencia de un cofactor y de un cosustrato que regenera dicho cofactor.

Los compuestos de fórmula (II), en la presente memoria también “sustrato”, son conocidos en la técnica.

Según la presente invención, el término “alquilo” quiere decir un grupo alquilo lineal o ramificado, saturado o no saturado. Según una realización preferente de la invención, alquilo C₁-C₆ es terc-butilo.

Según una realización preferente de la invención, R es COR₁.

Según otra realización preferente de la invención, R₁ es OR₂.

Según otra realización preferente de la invención, R es COOtBu o COObencilo.

La enzima oxidorreductasa que se usa en el procedimiento de la invención es, preferentemente, un polipéptido de levadura o de origen bacteriano.

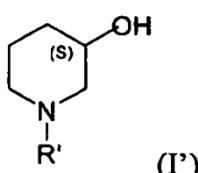
Según una realización ventajosa de la invención, el cofactor se selecciona entre nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD).

Según una realización ventajosa de la invención, el cosustrato es un alcohol secundario, preferentemente un alcohol secundario de hasta 10 átomos de carbono, tal como 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-heptanol y 2-octanol, preferentemente 2-propanol o 4-metil-2-pentanol, siendo 2-propanol lo más preferible.

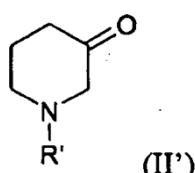
El uso de la enzima oxidorreductasa de ID SEC. N° 1 para la preparación del compuesto de fórmula (I) a partir de un compuesto de fórmula (II) constituye otro aspecto de la presente invención. Como alternativa, pueden usarse derivados de la misma, tales como una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60% de identidad con una cualquiera de dichas secuencias.

La ID SEC. N° 1 es una enzima oxidorreductasa preferida para el procedimiento de la invención.

Según un aspecto preferente, la invención versa sobre un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I')



en la que el carbono quiral está en la configuración (S), y R' se selecciona entre H, COOtBu o COObencilo, lo que comprende reducir un compuesto de fórmula (II')



en la que R' se define como anteriormente, con una oxidorreductasa de ID SEC. N° 1 en presencia de un cofactor y de un cosustrato que regenera dicho cofactor.

El cofactor y el cosustrato son, preferentemente, aquellos cuya preferencia ha sido indicada anteriormente. Así, según el aspecto más preferido, la invención versa sobre un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I') mediante reducción de un compuesto de fórmula (II') con una oxidorreductasa de ID SEC. N° 1, en presencia de NADH o NADPH como un cofactor y de un alcohol secundario, especialmente 2-propanol o 4-metil-2-pentanol, siendo lo más preferible 2-propanol como cosustrato regenerador de dicho cofactor.

Según una realización preferente, R' es COOtBu.

También se da a conocer un compuesto de fórmula (I') descrita anteriormente, que contiene menos del 0,1% del isómero (R), preferentemente con respecto a un compuesto de fórmula (I') en la que R' es COOtBu.

El organismo que produce las enzimas oxidorreductasa útiles en la reducción enzimática enantioselectiva puede ser una cepa natural o una variante, y probablemente se seleccione de una levadura o bacterias; por ejemplo, una levadura del genero *Candida* o *Pichia*.

5 La oxidorreductasa de ID SEC. Nº 1 es conocida en la técnica.

Un polipéptido que comprenda la ID SEC. Nº 1 puede estar codificada por una secuencia de ADN que es obtenible, por ejemplo, del organismo *Pichia capsulata* o por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibride con el mismo, según se da a conocer en el documento EP 1 633 779.

10 Las secuencias de ADN pueden ser cualquier codificación de ADN para el polipéptido (ID SEC. Nº 1). Puede ser un ADN que tenga la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID SEC. Nº 10, en el listado adjunto de secuencias, o el ADN que codifique polipéptidos que tengan actividad enzimática en la reducción asimétrica de la invención, y que se hibride con el ADN que tenga la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID SEC. Nº 10 en el listado de secuencias en las condiciones más estrictas.

15 La expresión "ADN que se hibride con el ADN que tenga la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID SEC. Nº 10 en el listado de secuencias en las condiciones más estrictas" significa un ADN obtenido mediante la técnica de hibridación de colonias, hibridación sobre placas o hibridación de Southern, usando el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID SEC. Nº 10 o parte de estos del listado de la secuencia como una sonda. Más específicamente, los ADN ahí mencionados pueden identificarse llevando a cabo la hibridación usando el filtro con el 20 ADN derivado de la colonia o la placa inmovilizado en el mismo, a 65°C en presencia de 0,7-1,0 M de NaCl, y el lavado del filtro con 0,1 a 2×SSC a 65°C (solución de SSC concentrada una vez que comprende 150 mM de NaCl y 15 mM de citrato sódico). La hibridación puede llevarse a cabo según el procedimiento descrito en Molecular cloning, A laboratory manual, 2^a edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) o en otros textos.

25 En la práctica, la reducción enzimática enantioselectiva se puede llevar a cabo usando una enzima oxidorreductasa en suspensión en la mezcla de reacción, o inmovilizada de manera convencional. La enzima puede ser utilizada en un estado completamente purificado, en un estado parcialmente purificado o en células microbianas en las que fue expresada. Las propias células pueden estar en un estado nativo, un estado permeabilizado o un estado lisado. Las personas con un dominio normal de la técnica apreciarán que el uso de la enzima en las células se prefiere para la 30 práctica del procedimiento de la invención, dado que representa un ahorro significativo de coste. Lo más preferible es que la enzima se exprese en *E. coli* y que se use como una suspensión de células nativas.

El procedimiento de reducción enzimática de compuestos de fórmula (II) o (II') puede llevarse a cabo en una mezcla de reacción que comprenda dicho compuesto de fórmula (II) o (II'), una oxidorreductasa, NADH o NADPH como un cofactor, un cosustrato, tal como un alcohol secundario y un tampón adecuado.

35 El exceso enantiomérico del compuesto de fórmula (I) o (I') formado en la reducción enzimática enantioselectiva es de al menos aproximadamente el 90%, preferentemente de al menos aproximadamente el 95%, y lo más preferible es que sea de al menos aproximadamente el 99%.

40 Derivados de las enzimas oxidorreductasa son los polipéptidos que tengan al menos un 60 (sesenta) por ciento de identidad con las ID SEC dadas anteriormente y que posean actividad de la oxidorreductasa. Los expertos en la técnica son conscientes de que hay disponibles sistemas y tecnología para determinar con precisión la identidad de las secuencias.

45 Para determinar la identidad porcentual de dos polipéptidos, se alinean las secuencias con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse espacios en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos para obtener un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos). A continuación, se comparan los residuos aminoácidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. La identidad porcentual entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % identidad=nº de posiciones idénticas/nº total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapadas×100).

50 En función de los anteriores principios generales, la "identidad porcentual" de dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990), modificado como en Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993). Tal algoritmo está incorporado en el programa BLAST de Altschul y otros (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros por defecto de los respectivos programas.

55 La reacción de reducción puede llevarse a cabo en un sistema de una sola fase que tenga células que contienen la enzima suspendida en las mismas. Alternativamente, la reacción puede llevarse a cabo en un sistema disolvente

acuoso/orgánico de dos fases descrito en los documentos US 2009/0017510 y US 7.371.903. La reacción puede llevarse a cabo como una reacción convencional por lotes o como un proceso continuo. Se apreciará que una de las ventajas significativas de la reducción enzimática enantioselectiva para aplicaciones comerciales es que está abierta a una operación continua.

- 5 Preferentemente, la mezcla de reacción contiene entre aproximadamente 35 g y 500 g de células por kg de materia prima producida por la reacción. La suspensión es la porción acuosa de la mezcla de reacción que también contiene un tampón, por ejemplo un tampón de TEA (triethanolamina), fosfato, Tris/HCl o glicina. El tampón puede comprender, además, iones para la estabilización de la enzima, por ejemplo, una fuente de iones de magnesio. Aditivos adicionales que pueden estar presentes en el tampón para estabilizar las enzimas pueden incluir un poliol, tal como glicerol, sorbitoles y similares, compuestos de azufre, tales como 1,4-DL-ditiotreitol, glutatión, cisteína o similares, aminoácidos y péptidos, o detergentes, tales como DMSO. Un estabilizante preferente para la enzima es un poliol, particularmente glicerol, que puede estar presente entre aproximadamente el 10 y el 80 por ciento, preferentemente aproximadamente el 50% en peso con respecto al peso de la suspensión celular.
- 10 El procedimiento de reducción enzimática enantioselectiva se lleva a cabo usando un principio de sustrato acoplado en el que la mezcla de reacción utiliza un cosustrato para la regeneración del cofactor, o coenzima, que funciona proporcionando hidrógeno para la reducción del sustrato de fórmula (II) o (II').
- 15 Preferentemente, el cofactor es utilizado en el estado reducido, es decir, NADPH o NADH, respectivamente. El cofactor está presente en la mezcla de reacción en una concentración entre aproximadamente 0,01 mM a 5 mM, preferentemente 0,05 mM a 0,5 mM.
- 20 En la reacción, el cosustrato funciona oxidándose en la regeneración del cofactor de NADPH o NADH. El cosustrato está presente en la mezcla de reacción entre aproximadamente el 10% y el 80% en volumen, preferentemente entre aproximadamente el 10% y el 50% en volumen, siendo lo más preferible que sea del 15-25% en volumen.
- 25 El cofactor oxidado formado durante la reducción del compuesto de fórmula (II) o (II') es regenerado por la oxidación del cosustrato, que también puede ser catalizado por la enzima oxidorreductasa. Así, una ventaja económica particular del presente procedimiento es que la enzima oxidorreductasa afecta tanto a la reducción del compuesto de fórmula (II) o (II') como a la oxidación del cosustrato; por lo tanto, para la regeneración del cofactor no tiene que usarse ninguna enzima adicional.
- 30 Sin embargo, también está en el alcance de la presente invención añadir otra enzima a la mezcla de reacción para la regeneración del cofactor para mejorar la tasa de reducción del sustrato de fórmula (II) o (II').
- 35 En una realización adicional, puede añadirse un disolvente orgánico que no está implicado en la regeneración del cofactor a la mezcla de reacción y llevarse a cabo el procedimiento de reducción en un sistema orgánico acuoso de 2 fases. Ejemplos de tales disolventes incluyen, sin limitación intencional, éter dietílico, éter terciario butilmetílico, éter diisopropílico, éter dibutílico, acetato etílico, acetato butílico, heptano, hexano o ciclohexano. Tal disolvente puede estar presente entre aproximadamente el 1% y el 50% en volumen con respecto al volumen de la mezcla de reacción.
- 40 La cantidad del sustrato de fórmula (II) o (II') en la mezcla de reacción es, preferentemente, mayor que aproximadamente el 0,1% en peso y puede aumentar hasta aproximadamente el 50% en peso, estando una concentración preferente entre aproximadamente el 5 y el 30% en peso. La cantidad de dicho sustrato variará dependiendo de la pureza del mismo, dado que el procedimiento puede llevarse a cabo con el sustrato en un estado purificado o como materia prima que contiene cantidades y tipos variables de impurezas.
- 45 El pH de la mezcla de reacción, tras la adición de todos los componentes, está en el intervalo de 5 a 10, preferentemente entre 7 y 9, y óptimamente un pH de aproximadamente 7,5.
- 50 La reducción enzimática según la presente invención se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 10-45°C, preferentemente de aproximadamente 20-40°C, siendo lo más preferible de aproximadamente 25-35°C.
- 55 El procedimiento de reducción enantioselectiva es rentable y respetuoso con el medioambiente, además de proporcionar los compuestos de fórmula (I) o (I') con un alto rendimiento y enantioselectividad muy alta. Así, puede obtenerse un compuesto de fórmula (I) o (I') de gran pureza óptica en presencia de la enzima en las condiciones de reacción anteriormente mencionadas en menos de entre aproximadamente 2 y 96 horas, preferentemente entre aproximadamente 4 y 24 horas.
- 60 Durante la incubación, el pH de la mezcla es mantenido en los intervalos dados anteriormente mediante la comprobación periódica y la adición de un reactivo convencional ácido o básico; por ejemplo, carbonato sódico e hidróxido sódico, respectivamente.

Sección experimental

Ejemplo 1 (no parte de la invención)

Preparación de la solución enzimática

Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* StarBL21 (De3) (Invitrogen) o células RB791 (acervo genético de *E. coli*, Yale, EE. UU.), respectivamente, con los constructos de expresión pET21-MIX, que codifican las diferentes oxidorreductasas. A continuación, las colonias de *Escherichia coli* transformadas con los constructos de expresión fueron cultivadas en 200 ml de medio de LB (1% triptona, 0,5% extracto de levadura y 1% NaCl) con 50 µg/ml de ampicilina o 40 µg/ml de kanamicina, respectivamente, hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0,5, medida a 550 nm. La expresión de la proteína recombinante fue inducida añadiendo isopropilitiogalactósido (IPTG) con una concentración de 0,1 mM. Después de 16 horas de inducción a 25°C y 220 rpm, las células fueron cosechadas y congeladas a -20°C.

Para la preparación de las soluciones enzimáticas, volvieron a suspenderse 30 g de células en 150 ml de tampón de trietanolamina (100 mM, pH 7, 2 mM MgCl₂, 10% glicerol) y se homogeneizó usando un homogeneizador de alta presión. Posteriormente, la solución enzimática fue mezclada con 150 ml de glicerol y almacenada a -20°C

15 Ejemplo 2

Preparación de la mezcla de reacción

Las mezclas de reacción se llevaron a cabo usando cofactores reducidos (A) y usando un cofactor oxidado en combinación con un cosustrato adecuado para la regeneración del cofactor reducido (B).

Dependiendo de los requisitos específicos de la enzima individual, se usaron bien tampón de fosfato potásico 100 mM pH= 7,5 o bien de trietanolamina 100 mM pH = 7,5. Además, el tampón puede contener 1 mM MgCl₂ o 10% (v/V) para la estabilización.

Reacción A

- 160 µl de tampón
- 25 • 100 µl de NADH/NADPH (40 mg/ml)
- 20 µl de 2-propanol
- 30 • 50 µl de la solución enzimática según el Ejemplo 1
- 2 mg de terc-butil 3-oxopiperidincarboxilato

Reacción B (con 2-propanol)

- 450 µl de tampón
- 35 • 0,05 mg de NAD/NADP
- 50 µl de la solución enzimática según el Ejemplo 1
- 10 mg de terc-butil 3-oxopiperidincarboxilato
- 40 • 50 µl de 2-propanol
- 50 µl de enzima para la regeneración, si se requiere

Reacción B (con 4-metil-2-pentanol)

- 45 • 250 µl de tampón
- 0,05 mg de NAD/NADP
- 50 µl de la solución enzimática según el Ejemplo 1
- 50 • 10 mg de terc-butil 3-oxopiperidincarboxilato
- 250 µl de 4-metil-2-pentanol

- 50 µl de enzima para la regeneración, si se requiere

Después de 24 h incubación, las muestras A y B fueron extraídas con diclorometano y analizadas usando CG. Las muestras fueron analizadas en busca de exceso y conversión enantioméricos.

Ejemplo 3

5 Preparación de terc-butil (3S)-3-hidroxipiperidincarboxilato usando oxidorreductasa de ID SEC. N° 1

Se añadieron 75 µl de una suspensión enzimática según el Ejemplo 1, de ID SEC. N° 1, a una mezcla de 450 µl de un tampón (100 mM fosfato potásico, pH 7,5, 1mM ZnCl₂), 50 mg de terc-butil 3-oxopiperidincarboxilato, 0,05 mg de NAD y 50 µl de 2-propanol. La mezcla de reacción fue incubada a temperatura ambiente con agitación constante cabal. Después de 24 h, el sustrato estaba completamente convertido al correspondiente terc-butil (3S)-3-hidroxipiperidincarboxilato, mostrando un exceso enantiomérico > 99,8%.

Los resultados están documentados en la Tabla 1

Tabla 1

Nº ID SEC	Conversión en la reacción A	terc-butil (3S)-3-hidroxi piperidincarboxilato	terc-butil (3R)-3-hidroxi piperidincarboxilato	Cofactor
ID SEC N°: 1	>99	99,8	0,2	NADH

Nº ID SEC	Conversión en la reacción B	terc-butil (3S)-3-hidroxi piperidincarboxilato	terc-butil (3R)-3-hidroxi piperidincarboxilato	Cofactor	Regeneración coenzimática aplicada
ID SEC N°: 1	>99	99,8	0,2	NAD	Sustrato acoplado, 2-propanol

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110>

<120> Reducción enzimática

<130>

20 <160> 18

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 341

<212> PRT

25 <213> Pichia capsulata

<400> 1

Met Ser Ala Leu Ser Lys Thr Gln Ala Gly Tyr Ile Phe Lys Lys Gly
1 5 10 15

30 Ala Gly His Ile Val Lys Ala Glu Val Pro Ile Pro Lys Pro Thr Gly
20 25 30

Ala Gln Ser Leu Leu Arg Val Lys Ala Ala Gly Met Cys His Ser Asp
35 40 45

35 Leu His Val Ile Gly Glu Thr Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Tyr Val
50 55 60

Leu Gly His Glu Ile Ala Gly Glu Leu Val Glu Ile Gly Asp Ser Val
65 70 75 80

ES 2 619 338 T3

	Asn Pro Glu Val Phe Lys Val Gly Gly Arg Tyr Ala Val His Gly Leu			
	85	90	95	
	Asn Ser Cys Gly Ser Cys Glu Met Cys Arg Thr Gly His Asp Asn Asp			
	100	105	110	
5	Cys Thr Gly Asn Glu Ser Lys Trp Tyr Gly Leu Gly Ile Ser Gly Gly			
	115	120	125	
	Tyr Gln Gln Tyr Leu Leu Val Pro Asn Ser His His Leu Leu Pro Ile			
	130	135	140	
10	Pro Asp Asn Val Ser Tyr Glu Val Ala Ala Ala Thr Ser Asp Ala Val			
	145	150	155	160
	Leu Thr Pro Tyr His Ala Ile Lys Asn Ser Gly Val Thr Pro Ser Ser			
	165	170	175	
	Lys Val Leu Met Phe Gly Leu Gly Gly Leu Gly Ser Asn Ala Leu Gln			
	180	185	190	
15	Ile Leu Lys Ala Phe Gly Ala Tyr Val Val Ala Val Asp Val Lys Pro			
	195	200	205	
	Ala Ser Lys Ala Ile Ala Asp Glu Phe Lys Ala Asp Glu Phe Tyr Thr			
	210	215	220	
20	Asp Ile Ser Gln Ser Ser Trp Lys Pro Ala Ser Phe Asp Tyr Cys Phe			
	225	230	235	240
	Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Thr Phe Asp Ile Cys Gln Lys Tyr Ile			
	245	250	255	
	Lys Ser His Gly Thr Ile Phe Pro Val Gly Leu Gly Ser Ser Lys Leu			
	260	265	270	
25	Thr Phe Asp Leu Gly Asn Leu Ala Leu Arg Glu Val Lys Ile Val Gly			
	275	280	285	
	Asn Phe Trp Gly Thr Ser Gln Glu Gln Ile Glu Ala Met Glu Leu Val			
	290	295	300	
30	Ser Ser Gly Arg Val Lys Pro Gln Val His Thr Thr Glu Leu Glu Asn			
	305	310	315	320
	Leu Pro Glu Ser Leu Glu Lys Leu Glu Glu Gly Lys Ile Asn Gly Arg			
	325	330	335	
	Leu Val Met Leu Pro			
	340			
35	<210> 2			
	<211> 348			
	<212> PRT			
	<213> Rhodococcus erythropolis			
40	<400> 2			
	Met Lys Ala Ile Gln Tyr Thr Arg Ile Gly Ala Glu Pro Glu Leu Thr			
	1	5	10	15
45	Glu Ile Pro Lys Pro Glu Pro Gly Pro Gly Glu Val Leu Leu Glu Val			
	20	25	30	
	Thr Ala Ala Gly Val Cys His Ser Asp Asp Phe Ile Met Ser Leu Pro			

ES 2 619 338 T3

	35	40	45
	Glu Glu Gln Tyr Thr Tyr Gly Leu Pro Leu Thr Leu Gly His Glu Gly		
	50	55	60
5	Ala Gly Lys Val Ala Ala Val Gly Glu Gly Val Glu Gly Leu Asp Ile		
	65	70	75
	Gly Thr Asn Val Val Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly Asn Cys Trp		
	85	90	95
	His Cys Ser Gln Gly Leu Glu Asn Tyr Cys Ser Arg Ala Gln Glu Leu		
	100	105	110
10	Gly Ile Asn Pro Pro Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ala Leu Ala Glu Phe		
	115	120	125
	Met Ile Val Asp Ser Pro Arg His Leu Val Pro Ile Gly Asp Leu Asp		
	130	135	140
15	Pro Val Lys Thr Val Pro Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His		
	145	150	155
	Ala Ile Lys Arg Ser Leu Pro Lys Leu Arg Gly Gly Ser Tyr Ala Val		
	165	170	175
	Val Ile Gly Thr Gly Gly Leu Gly His Val Ala Ile Gln Leu Leu Arg		
	180	185	190
20	His Leu Ser Ala Ala Thr Val Ile Ala Leu Asp Val Ser Ala Asp Lys		
	195	200	205
	Leu Glu Leu Ala Thr Lys Val Gly Ala His Glu Val Val Leu Ser Asp		
	210	215	220
25	Lys Asp Ala Ala Glu Asn Val Arg Lys Ile Thr Gly Ser Gln Gly Ala		
	225	230	235
	Ala Leu Val Leu Asp Phe Val Gly Tyr Gln Pro Thr Ile Asp Thr Ala		
	245	250	255
	Met Ala Val Ala Gly Val Gly Ser Asp Val Thr Ile Val Gly Ile Gly		
	260	265	270
30	Asp Gly Gln Ala His Ala Lys Val Gly Phe Phe Gln Ser Pro Tyr Glu		
	275	280	285
	Ala Ser Val Thr Val Pro Tyr Trp Gly Ala Arg Asn Glu Leu Ile Glu		
	290	295	300
35	Leu Ile Asp Leu Ala His Ala Gly Ile Phe Asp Ile Ala Val Glu Thr		
	305	310	315
	Phe Ser Leu Asp Asn Gly Ala Glu Ala Tyr Arg Arg Leu Ala Ala Gly		
	325	330	335
	Thr Leu Ser Gly Arg Ala Val Val Val Pro Gly Leu		
	340	345	
40	<210> 3		
	<211> 338		
	<212> PRT		
	<213> Metschnikowia zobellii		
45	<400> 3		

ES 2 619 338 T3

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

ES 2 619 338 T3

<210> 4

<211> 336

<212> PRT

5 <213> candida parapsilosis

<400> 4

Met	Ser	Ile	Pro	Ser	Ser	Gln	Tyr	Gly	Phe	Val	Phe	Asn	Lys	Gln	Ser
1															
														15	

10	Gly	Leu	Asn	Leu	Arg	Asn	Asp	Leu	Pro	Val	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Gly
														20	30	

Gln	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Asp	Ala	Val	Gly	Leu	Cys	His	Ser	Asp	Leu
														35	45

15	His	Val	Ile	Tyr	Glu	Gly	Leu	Asp	Cys	Gly	Asp	Asn	Tyr	Val	Met	Gly
														50	60	

His	Glu	Ile	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Gly	Asp	Asp	Val	Ile	Asn
														65	80

Tyr	Lys	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Ala	Cys	Val	Gly	Pro	Asn	Gly	Cys	Gly
														85	95

20	Gly	Cys	Lys	Tyr	Cys	Arg	Gly	Ala	Ile	Asp	Asn	Val	Cys	Lys	Asn	Ala
														100	110	

Phe	Gly	Asp	Trp	Phe	Gly	Leu	Gly	Tyr	Asp	Gly	Gly	Tyr	Gln	Gln	Tyr
														115	125

25	Leu	Leu	Val	Thr	Arg	Pro	Arg	Asn	Leu	Ser	Arg	Ile	Pro	Asp	Asn	Val
														130	140	

Ser	Ala	Asp	Val	Ala	Ala	Ala	Ser	Thr	Asp	Ala	Val	Leu	Thr	Pro	Tyr
														145	160

His	Ala	Ile	Lys	Met	Ala	Gln	Val	Ser	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Leu	Leu
														165	175

30	Ile	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Asn	Ala	Ile	Gln	Val	Ala	Lys	Ala
														180	190	

Phe	Gly	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Asp	Lys	Lys	Lys	Glu	Ala	Arg	Asp
														195	205

35	Gln	Ala	Lys	Lys	Leu	Gly	Ala	Asp	Ala	Val	Tyr	Glu	Thr	Leu	Pro	Glu
														210	220	

Ser	Ile	Ser	Pro	Gly	Ser	Phe	Ser	Ala	Cys	Phe	Asp	Phe	Val	Ser	Val
														225	240

Gln	Ala	Thr	Phe	Asp	Val	Cys	Gln	Lys	Tyr	Val	Glu	Pro	Lys	Gly	Val
														245	255

40	Ile	Met	Pro	Val	Gly	Leu	Gly	Ala	Pro	Asn	Leu	Ser	Phe	Asn	Leu	Gly
														260	270	

Asp	Leu	Ala	Leu	Arg	Glu	Ile	Arg	Ile	Leu	Gly	Ser	Phe	Trp	Gly	Thr
														275	285

45	Thr	Asn	Asp	Leu	Asp	Asp	Val	Leu	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Gly	Lys	Val
														290	300	

Lys	Pro	Val	Val	Arg	Ser	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Leu	Pro	Glu	Tyr	Ile

ES 2 619 338 T3

	305	310	315	320												
	Glu	Lys	Leu	Arg	Asn	Asn	Ala	Tyr	Glu	Gly	Arg	Val	Val	Phe	Asn	Pro
5	<210> 5															
	<211> 352															
	<212> PRT															
	<213> Thermoanaerobacter brockii															
	<400> 5															
10	Met	Lys	Gly	Phe	Ala	Met	Leu	Ser	Ile	Gly	Lys	Val	Gly	Trp	Ile	Glu
	1					5				10					15	
	Lys	Glu	Lys	Pro	Ala	Pro	Gly	Pro	Phe	Asp	Ala	Ile	Val	Arg	Pro	Leu
									20			25			30	
15	Ala	Val	Ala	Pro	Cys	Thr	Ser	Asp	Ile	His	Thr	Val	Phe	Glu	Gly	Ala
									35			40			45	
	Ile	Gly	Glu	Arg	His	Asn	Met	Ile	Leu	Gly	His	Glu	Ala	Val	Gly	Glu
									50			55			60	
20	Val	Val	Glu	Val	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Asp	Phe	Lys	Pro	Gly	Asp	Arg
								65			70			75		80
	Val	Val	Val	Pro	Ala	Ile	Thr	Pro	Asp	Trp	Arg	Thr	Ser	Glu	Val	Gln
								85			90				95	
	Arg	Gly	Tyr	His	Gln	His	Ser	Gly	Gly	Met	Leu	Ala	Gly	Trp	Lys	Phe
								100			105				110	
25	Ser	Asn	Val	Lys	Asp	Gly	Val	Phe	Gly	Glu	Phe	Phe	His	Val	Asn	Asp
								115			120			125		
	Ala	Asp	Met	Asn	Leu	Ala	His	Leu	Pro	Lys	Glu	Ile	Pro	Leu	Glu	Ala
								130			135			140		
30	Ala	Val	Met	Ile	Pro	Asp	Met	Met	Thr	Thr	Gly	Phe	His	Gly	Ala	Glu
								145			150			155		160
	Leu	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Gly	Ala	Thr	Val	Ala	Val	Leu	Gly	Ile	Gly
								165			170			175		
	Pro	Val	Gly	Leu	Met	Ala	Val	Ala	Gly	Ala	Lys	Leu	Arg	Gly	Ala	Gly
								180			185				190	
35	Arg	Ile	Ile	Ala	Val	Gly	Ser	Arg	Pro	Val	Cys	Val	Asp	Ala	Ala	Lys
								195			200			205		
	Tyr	Tyr	Gly	Ala	Thr	Asp	Ile	Val	Asn	Tyr	Lys	Asp	Gly	Pro	Ile	Glu
								210			215			220		
40	Ser	Gln	Ile	Met	Asn	Leu	Thr	Glu	Gly	Lys	Gly	Val	Asp	Ala	Ala	Ile
								225			230			235		240
	Ile	Ala	Gly	Gly	Asn	Ala	Asp	Ile	Met	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Val
								245			250			255		
	Lys	Pro	Gly	Gly	Thr	Ile	Ala	Asn	Val	Asn	Tyr	Phe	Gly	Glu	Gly	Glu
								260			265			270		
45	Val	Leu	Pro	Val	Pro	Arg	Leu	Glu	Trp	Gly	Cys	Gly	Met	Ala	His	Lys
								275			280			285		

ES 2 619 338 T3

Thr Ile Lys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Gly Arg Leu Arg Met Glu Arg
 290 295 300
 Leu Ile Asp Leu Val Phe Tyr Lys Arg Val Asp Pro Ser Lys Leu Val
 305 310 315 320
 5 Thr His Val Phe Arg Gly Phe Asp Asn Ile Glu Lys Ala Phe Met Leu
 325 330 335
 Met Lys Asp Lys Pro Lys Asp Leu Ile Lys Pro Val Val Ile Leu Ala
 340 345 350
 10 <210> 6
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> *Microbacterium* sp.
 <400> 6
 15 Met Lys Ala Leu Gln Tyr Thr Lys Ile Gly Ser His Pro Glu Val Val
 1 5 10 15
 Glu Ile Glu Lys Pro Ser Pro Gly Pro Gly Gln Val Leu Leu Lys Val
 20 25 30
 20 Thr Ala Ala Gly Val Cys His Ser Asp Glu Phe Val Met Ser Leu Ser
 35 40 45
 Glu Glu Gln Tyr Thr Ala Ala Gly Tyr Pro Leu Pro Leu Thr Leu Gly
 50 55 60
 His Glu Gly Ala Gly Ile Val Glu Glu Leu Gly Glu Gly Val Glu His
 65 70 75 80
 25 Leu Ser Val Gly Asp Ala Val Ala Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly
 85 90 95
 Arg Cys Arg Asn Cys Ala Gln Gly Lys Glu Asn Tyr Cys Thr Asn Ala
 100 105 110
 30 Gln Ala Glu Gly Ile Met Pro Pro Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ser Met
 115 120 125
 Ala Glu Tyr Met Ile Val Asp Ser Ala Arg His Leu Val Pro Leu Gly
 130 135 140
 Asp Leu Asp Pro Val Gln Asn Val Ser Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr
 145 150 155 160
 35 Pro Tyr His Ala Val Lys Thr Ser Leu Pro Lys Leu Gly Ala Gly Thr
 165 170 175
 Thr Ala Val Val Ile Gly Thr Gly Gly Leu Gly His Val Ala Ile Gln
 180 185 190
 40 Ile Leu Arg Ala Val Ser Ala Ala Thr Val Ile Ala Leu Asp Val Asn
 195 200 205
 Asp Glu Lys Leu Ala Leu Ala Lys Glu Val Gly Ala His His Thr Val
 210 215 220
 Met Ser Asp Gly Gly Ala Val Asp Ala Ile Arg Arg Leu Thr Asp Gly
 225 230 235 240
 45 Leu Gly Ala Asn Ala Val Phe Asp Phe Val Gly Ala Asp Pro Thr Ile
 245 250 255

ES 2 619 338 T3

Ala Thr Ala Ile Gly Ala Ala Ala Leu Asp Ala Asp Ile Thr Ile Val
 260 265 270
 Gly Ile Gly Gly Gly Thr Ala His Val Gly Phe Gly Thr Val Ala Tyr
 275 280 285
 5 Asp Ala Ala Leu Arg Ile Pro Tyr Trp Gly Ser Arg Ser Glu Leu Ile
 290 295 300
 Glu Val Leu Asp Leu Ala Arg Ser Gly Gln Val Gly Val Glu Ile Gln
 305 310 315 320
 10 Arg Tyr Ser Leu Asp Asp Gly Pro Lys Ala Tyr Glu Ala Leu Ala Ala
 325 330 335
 Gly Thr Val Arg Gly Arg Ala Val Ile Val Pro
 340 345

<210> 7
 15 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Rhodococcus ruber

<400> 7

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

25 Thr Ala Ala Gly Leu Cys His Ser Asp Ile Phe Val Met Asp Met Pro
 35 40 45
 Ala Glu Gln Tyr Ile Tyr Gly Leu Pro Leu Thr Leu Gly His Glu Gly
 50 55 60

Val Gly Thr Val Ala Glu Leu Gly Ala Gly Val Thr Gly Phe Glu Thr
 65 70 75 80

30 Gly Asp Ala Val Ala Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly Ala Cys His
 85 90 95
 Ala Cys Ala Arg Gly Arg Glu Asn Tyr Cys Thr Arg Ala Ala Glu Leu
 100 105 110

35 Gly Ile Thr Pro Pro Gly Leu Gly Ser Pro Gly Ser Met Ala Glu Tyr
 115 120 125

Met Ile Val Asp Ser Ala Arg His Leu Val Pro Ile Gly Asp Leu Asp
 130 135 140

Pro Val Ala Ala Val Pro Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His
 145 150 155 160

40 Ala Ile Ser Arg Val Leu Pro Leu Leu Gly Pro Gly Ser Thr Ala Val
 165 170 175
 Val Ile Gly Val Gly Gly Leu Gly His Val Gly Ile Gln Ile Leu Arg
 180 185 190

45 Ala Val Ser Ala Ala Arg Val Ile Ala Val Asp Leu Asp Asp Asp Arg
 195 200 205
 Leu Ala Leu Ala Arg Glu Val Gly Ala Asp Ala Ala Val Lys Ser Gly

ES 2 619 338 T3

	210	215	220	
	Ala Gly Ala Ala Asp Ala Ile Arg Glu Leu Thr Gly Gly Glu Gly Ala			
	225	230	235	240
5	Thr Ala Val Phe Asp Phe Val Gly Ala Gln Ser Thr Ile Asp Thr Ala			
	245	250	255	
	Gln Gln Val Val Ala Ile Asp Gly His Ile Ser Val Val Gly Ile His			
	260	265	270	
	Ala Gly Ala His Ala Lys Val Gly Phe Phe Met Ile Pro Phe Gly Ala			
	275	280	285	
10	Ser Val Val Thr Pro Tyr Trp Gly Thr Arg Ser Glu Leu Met Asp Val			
	290	295	300	
	Val Asp Leu Ala Arg Ala Gly Arg Leu Asp Ile His Thr Glu Thr Phe			
	305	310	315	320
15	Thr Leu Asp Glu Gly Pro Thr Ala Tyr Arg Arg Leu Arg Glu Gly Ser			
	325	330	335	
	Ile Arg Gly Arg Gly Val Val Val Pro Gly			
	340	345		
	<210> 8			
20	<211> 336			
	<212> PRT			
	<213> Pichia stipidis			
	<400> 8			
25	Met Ser Ile Pro Ala Thr Gln Tyr Gly Phe Val Phe Thr Lys Lys Asp			
	1	5	10	15
	Gly Leu Lys Ile Arg Glu Asn Met Pro Val Leu Glu Pro Lys Ala Asp			
	20	25	30	
30	Gln Val Leu Leu Lys Val Asp Ala Val Gly Leu Cys His Ser Asp Leu			
	35	40	45	
	His Ala Ile Tyr Asp Gly Phe Asp Phe Gly Asp Asn Tyr Val Met Gly			
	50	55	60	
	His Glu Ile Ala Gly Thr Ile Val Lys Lys Gly Ala Met Val Asp Phe			
	65	70	75	80
35	Trp Asp Leu Asn Thr Arg Val Ala Cys Phe Gly Pro Asn Ser Cys Gly			
	85	90	95	
	His Cys Gln Leu Cys Arg Thr Gly Phe Glu Asn Asp Cys Ile Asn Val			
	100	105	110	
40	Val Asn Gly Trp Phe Gly Leu Gly Lys Asn Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr			
	115	120	125	
	Leu Leu Val Glu Lys Pro Arg Asn Leu Val Ala Ile Pro Asp Asn Val			
	130	135	140	
	Glu Leu Ser Asp Ala Ala Ala Ile Thr Asp Ala Leu Leu Thr Pro Tyr			
	145	150	155	160
45	His Ala Met Arg Leu Ala Gly Val Arg Ser Gly Thr Lys Leu Leu Gln			
	165	170	175	

ES 2 619 338 T3

	Ile Gly Ala Gly Gly Leu Gly Val Asn Gly Ile Gln Ile Ala Lys Ala			
	180	185	190	
	Phe Gly Ala Gln Val Thr Val Ile Asp Lys Lys Pro Glu Ala Val Asp			
	195	200	205	
5	Val Ala Lys Ser Leu Gly Ala Asp Glu Val Tyr Ser Ala Leu Pro Glu			
	210	215	220	
	Ser Thr Ser Pro Gly Ser Phe Asp Val Ala Ile Asp Tyr Val Ser Thr			
	225	230	235	240
10	Gln Gly Thr Phe Asp Thr Cys Gln Lys Tyr Val Arg Ser Lys Gly Asn			
	245	250	255	
	Ile Val Pro Val Gly Leu Ala Ala Pro Arg Ile Ser Phe Asn Leu Gly			
	260	265	270	
	Asp Leu Ala Leu Arg Glu Ile Asn Val Leu Gly Ser Phe Trp Gly Thr			
	275	280	285	
15	Ser Ser Asp Leu Lys Glu Cys Phe Asp Leu Val Ser Lys Gly Lys Val			
	290	295	300	
	Lys Pro Lys Val Thr Val Ala Pro Leu Lys Gln Leu Pro Glu Tyr Ile			
	305	310	315	320
20	Val Lys Leu Gln Asn Ser Ala Tyr Glu Gly Arg Val Val Phe Lys Pro			
	325	330	335	
	<210> 9			
	<211> 347			
	<212> PRT			
25	<213> Gordona rubropertinctus			
	<400> 9			
	Met Lys Ala Ile Gln Ile Gln Pro Gly Lys Pro Pro Glu Leu Arg			
	1	5	10	15
30	Glu Val Glu Lys Pro Thr Pro Arg Pro Gly Gln Val Leu Leu Lys Val			
	20	25	30	
	Thr Ala Ala Gly Ala Cys His Ser Asp Asp Phe Val Leu Asn Leu Pro			
	35	40	45	
35	Glu Glu Gly Phe Pro Tyr Pro Leu Pro Met Thr Leu Gly His Glu Gly			
	50	55	60	
	Ala Gly Val Val Ala Glu Val Gly Thr Gly Val Thr Gly Ile Ser Glu			
	65	70	75	80
	Gly Thr Ser Val Ala Val Tyr Gly Ala Trp Gly Cys Gly Val Cys His			
	85	90	95	
40	Phe Cys Ala Arg Gly Leu Glu Asn Tyr Cys Ser Arg Ala Gly Glu Leu			
	100	105	110	
	Gly Ile Thr Pro Pro Gly Leu Gly Asn Pro Gly Ala Met Ala Glu Tyr			
	115	120	125	
45	Leu Leu Val Asp Asp Ala Arg His Leu Val Pro Leu Gly Asp Leu Asp			
	130	135	140	
	Pro Val Ala Ala Val Pro Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His			

ES 2 619 338 T3

	145	150	155	160
	Ala Ile Lys Pro Ser Leu Pro Lys Leu Val Gly Gly Thr Thr Ala Val			
	165	170		175
5	Val Ile Gly Ala Gly Gly Leu Gly His Val Gly Ile Gln Leu Leu Arg			
	180	185		190
	His Leu Thr Pro Ser Arg Val Ile Ala Leu Asp Val Ser Asp Asp Lys			
	195	200	205	
	Leu Ala Phe Ala Arg Glu Val Gly Ala His Glu Val Val Leu Ser Asp			
	210	215	220	
10	Ala Asp Ala Val Ala Asn Val Arg Lys Ile Thr Gly Asn Asp Gly Ala			
	225	230	235	240
	Thr Ala Val Phe Asp Phe Val Gly Leu Gln Pro Thr Leu Asp Ile Ala			
	245	250		255
15	Met Gly Val Val Gly Thr Met Gly Asp Val Val Ile Val Gly Ile Gly			
	260	265		270
	Asp Met Val Ala Thr Ala Lys Val Gly Phe Phe Thr Gln Pro Tyr Glu			
	275	280		285
	Val Ser Val Arg Ala Pro Tyr Trp Gly Ala Arg Asp Glu Leu Ile Glu			
	290	295	300	
20	Val Leu Asp Leu Ala Arg Asp Gly Val Leu Glu Val Ala Val Glu Arg			
	305	310	315	320
	Phe Ser Leu Asp Asp Gly Val Glu Ala Tyr Arg Arg Leu Ala Ala Asn			
	325	330		335
25	Asp Leu Arg Gly Arg Ala Val Val Val Pro Asp			
	340	345		
	<210> 10			
	<211> 1026			
	<212> ADN			
30	<213> Pichia capsulata			
	<400> 10			
	atgtctgctc tctccaaaac ccaggccgg tacatttca agaagggtgc cggtcacatc			
				60
	gtcaaggccg aggttccaat ccccaagcca actggcgccc aatctttct tagggtaag			
35				120
	gctgcaggaa tgtgcactc tgacttgac gtcattggag aaacattgga ggtccctacc			
				180
	gatgggtacg tgctcggtca cggaaattgct ggtgaattgg tggagatcg agactcggtc			
				240
	aacccctgaag ttttaaggt gggaggccgt tatgctgttc atgactgaa ttcgtgtgga			
				300
	tcctgtgaga tgtgtcgtac cggtcatgac aatgactgta ctgaaatga atcgaaatgg			
				360
	tacggctctgg gaattagtgg tggttaccag cagttacgtc tggtgcctaa ttgcacccat			
				420
	ctattgccta ttccagataa cgtgtcctac gaagttgtc ctgccaccc ttagtgcgtc			
40				480
	ttgactccat accatgttat caagaattcc ggagtgtactc catcttctaa ggtgttgatg			
				540
	tttggctctgg gtggttggg atcgaacgca cttcagatcc tcaaggcatt tggagcctat			
				600
	gtgggtgccg ttgatgtcaa gccgcaccc aaagcaattt ccgacgaaatt caaagcgat			
				660
45	gaattctata ccgatatcg ccaatcttct tggaaaccag cctcggttga ttactgttt			
				720
	gacttcgttt cgctgcaggat cacccatcgac atctgcacca agtataatcaa gtccccacgg			
				780
	accatcttcc cagtgggtct gggctcgagc aagctgactt tcgacttggg aaacctggca			
				840
	ttgcgtgaag taataattgt tggtacttc tggggtaactt ctcaggaaca gatcgaaagca			
				900
	atggagctgg ttagtcggg tagggtaag cctcaagttt acaccaccga acttgaaaaac			
				960
50	cttcctgaat cacttgaaaa actggaggag ggttaagatca atgaaagatt ggttatgttt			
				1020
	ccatga			
				1026

<210> 11

ES 2 619 338 T3

<211> 1047

<212> ADN

<213> Rhodococcus erythropolis

<400> 11

5	atgaaggcaa tccagtagcac gagaatcgcc gcggaaacccg aactcacgg aattcccaaa cccgagcccc gtccaggtga agtgctcctg gaagtacaccg ctgccggcgt ctgcacactcg gacgacttca tcatgagcct gcccgaaagag cagtagcaccc acggccttcc gctcacgctc ggccacgaaag gcgcaggcaa ggtcgccgccc gtcggcgagg gtgtcgaaagg tctcgacatc 10 ggaaccaatg tcgtcgctca cgggccttgg gttgtggca actgttggca ctgctcacaa gactcgaga actattgctc tcgcgcctaa gaactcgaa tcaatcctcc cggtctcggt gcacccggcg cgttggccga gttcatgatc gtcgatttcc tcgcacccct tgcggccatc gttgacactcg acccggtcaa gacgggtccg ctgaccgacg ccggctcgac gccgtatcac 15 gcgatcaagc gttctcgcc gaaacttcgc ggaggctcg acgggttgcgatttgc ggcgggctcg gccacgtcgc cattcagctc ctccgtcacc tctcggcggc aacggtcata gctttggacg tgagcgcgaa caagctcgaa ctggcaacca agtaggcgc tcacgagggt gttctgtcg acaaggacgc ggccgagaac gttcgaaaga tcactggaag tcaaggcgcc 20 gcactggttc tcgacttcgt cgctaccag cccaccatcg acaccgcgat ggctgtcgcc gttgtcgat cagacgtcac gatcgtcggg atcgggacg gccaggccca cgccaaagtc gggttcttcc aaagtcccta cgaggcttcg gtgacagttc cgtattgggg tgcccgcaac gagttgatcg aattgatcgaa cctcgccac gccggcatct tcgacatcgcc ggtggagacc ttcagtctcg acaacgggtgc cgaaggctat cgacgactgg ctggcggaaac gctcagcggc cgtgcgggat ttgtccctgg tctgttag 1047
---	---

25 <210> 12

<211> 1018

<212> ADN

<213> Metschnikowia zobellii

<400> 12

30	atgaccactt cagttttgt ctctggtgcc accggcttca ttggccagca cgtcgtcaaa ctctttctct cgaaaggcta caacgtcggt ggctccgtca gaaccggcga gaaaggcaag aacctagcaa agctatttgg caccggctcc ttccatccag aggtgggtgcc caaactcgaa gcccctgggtg cctttgacga ggcccttggaa aagcatccag aggtgtctgt gttttgcac 35 acggcctcgcc ccgtcacctt tgacgtcaag gacattgaga aagagttgtct gtcgaggggca cccaaaacgt ctttagtgcc atcaaagccc acggcccgca gatcaaaaaac gtcgtgtgtg cgtcctctgt tgctgcggca ctgcatccc ctagaaacct ggaccccccacg ttcaactgtga atgaagactc ttggaaaccca attcgttggg aggactcgaa gcagaacgccc atgaccgggtt actttggctc caagaagttt gcagagaagg ccgcgtgggaa ttttgtggaa 40 gccgagaagc ccaacttct gtgttaacacc gtgttgcggc tgtaacgttt tgccccccag gcgttgact ccgagggtca gggcgagctc aactactctg ccgaaatcat caacaagttg ttgaagttgg gaccaaacga cgaagtgcctc tcgcaacttgg gggtttgcgt cgacgtgaga gacgtggcca aggctactt gggcgatcc gagggcgac tctcgaacca ggcgccttttgc cttagaacgg cagcgtttaa tgccaaacgc gtgttgaca taatcaacaa taagtttgc 45 aacttgagag gacagggtcc cactggaaacg cttgtaaaag gcgagcctga aagcactggc tctgtacgg acaattcgag aaccaagaag ttattgaact tcccagccat cgacttggag aactgtgtgg tggactcggt tacccagctc atgaagtccc agaagaaggt tttgtaaag 1018
----	---

<210> 13

50 <211> 1011

<212> ADN

<213> Candida parapsilosis

<400> 13

55	atgtcaattc catcaagcca gtacggattc gtattcaata agcaatcagg acttaatctg agaaatgatt tgcctgtcca caagccaaa gcgggtcaat tttttgttggaa agttgtatgt gttggattgt gtcattctga ttacatgtc atttacaaag gttggatttgg tgggtataat tatgtcatgg gacatgaaat tgctggaaact gttgtgtgt tggtgtatgtat tacaagggtt gttgtatgtgt tgctgtgtc ggacccatg gatgtgtgg tgcaagttat 60 tgcgtgtgtt ccattgacaa tgatgtaaa aacgcattt gttgtgttggt cggattgggg tacgtgtgtt ggtatcaaca gtacttggg gttacttagac cacgtactt gtctcgatc cagataacg tatctgcaga cttggctgcg gcttcaactg atgtgttattt gacaccat cagcaatca agatggctca agtgcacca acttcgataa tcttgcttat tgggtgttgg 540
----	--

ES 2 619 338 T3

	ggattgggtg gaaatcaat tcaagttgcc aaggcattt gtgcgaaagt tactgtttt 600
	gacaaaaaaaa aggaggctcg tgaccaagca aagaagttgg gtgctgatgc agtttatgaa 660
	acattgccag aatccatttc tcctggctct tttcagcat gttttagtt tgttcagtg 720
5	caagctacat ttgatgtatc tcaaaagtat gttgaaccaa aggtgtaat tatgcccgtg 780
	gactcgggtg ctcataattt atcgatattt ttggggagatt tggcatttag agaaattcga 840
	atcttgggtt gttttgggg aactactaat gatttggatg atgttttga attggtagt 900
	gaaggtaaag taaaaccgt tggagaatgt gccaatttga aggaatttgc agatataatt 960
	aaaaatttga gaaacaatgc ttatgaaggt agagttttt ttaatccata g 1011
10	<210> 14
	<211> 1059
	<212> ADN
	<213> Thermoanaerobacter brockii
	<400> 14
15	atgaaagggtt ttgcaatgct cagtatcggt aaagttggct ggatttggaa ggaaaaggcct 60
	gctcctggcc catttgcatttgc tatttgcatttgc cctctagctg tggcccttg cacttcggac 120
	attcataccg ttttgcatttgc cggcatttgc gaaagacata acatgatact cggtcacgaa 180
20	gctgttaggtg aagttagttgc agtaggtatg gaggtaaaag attttaaacc tggtgatcgc 240
	gttggatgtgc cagctattac ccctgatttgc cggacctctg aagtacaaag aggatatac 300
	cagcactccg gtggaatgct ggcaggctgg aaattttcga atgaaaaga tggtgttttt 360
	gttggatgtgc cagctattac ccctgatttgc cggacctctg aagtacaaag aggatatac 420
25	ccatttgcatttgc ttcatttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc taaagaaatt 480
	ctggcagata tagaatttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 540
	atggcagtcgc ctggtgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 600
	ccagtttgcatttgc tagatgtgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 660
	gttggatgtgc aaagtgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 720
30	atcgctggatgc gaaatgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 780
	accatgcatttgc atgaaaatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 840
	tggggatgtgc gcatgctca taaaactata aaaggccggc tatgccccgg tggacgtcta 900
	actcacgttttccgggatgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 960
	actcacgttttccgggatgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 1020
	ccaaaagacc taatcaaacc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 1059
35	<210> 15
	<211> 1044
	<212> ADN
	<213> Microbacterium sp.
	<400> 15
40	atgaaggcac tccagttcacac gaagatcgga tcccaccccg aagtcgtcgat gatcgagaag 60
	ccctcgccgg gtttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 120
	gacgagttcg ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 180
45	ctcaccctcg ggcacaaagg cggccggcatc gtcgaggagc tcggcgaagg ttttttttttgcatttgc 240
	ctgagcgtcg gagacgcgttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 300
	tttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 360
	ggttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 420
	gttccgtcg ggcacaaagg cggccggcatc gtcgaggagc tcggcgaagg ttttttttttgcatttgc 480
50	ccgttaccacg cggtaaaggac gtcacttccg aagctggcgcc cggaaacgc ggcggcgatc 540
	atcgccaccc ggggttctcg acacgtcgat gtttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 600
	accgttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 660
	catcacaccc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 720
	ctggccggcgatc acggccgttttccgcacttcgtc ggttgcggacc cgacgtcgatc gacggcgatc 780
55	ggagcagccg cgctcgacgc agacatcacg atcgccggcgatc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 840
	gttggatgtgc gcatgctca ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 900
	agcgaacttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 960
	cgcttacttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 1020
	ccggccggcc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc ttttttttttgcatttgc 1044
60	<210> 16
	<211> 1041
	<212> ADN
	<213> Rhodococcus ruber

ES 2 619 338 T3

<400> 16

	atgaaaagccc tccagtacac cgagatcgcc tccgagccgg tcgtcgctga cgtccccacc	60
5	ccggcgcccc ggccgggtga gatcctcgta aaggtcaccg cggccggctt gtgccactcg	120
	gacatcttcg ttagtggacat gccggcagag cagtagatct acgtcttcc cttcacccctc	180
	ggccacgagg gcgtcgccac cgtcgccgaa ctgcggccgg gcgtcaccgg attcgagacg	240
	ggggacgccc tcgcccgtgt cggggccgtgg ggggtcgccgt cggtccacgc gtgcgcgc	300
10	ggccgggaga actactgcac ccgcgcggcc gagctggca tcacccggcc cggtctcg	360
	tcgcccgggt cgatggccga gtacatgtac gtgcactcg cgccgcacct cgtcccgatc	420
	ggggacctcg accccgtcgc ggcgggttccg ctcaccgacg cggccgtac gccgtaccac	480
	gtgatctcg gggctctggc cctgtctgggcca cccggctcga cccggctcgat catcggttgc	540
	ggcggactcg ggcacgtcg catccagato ctgcgcgcgc tcagcgcgc cccgtgtatc	600
	gccgtcgatc tcgacacga ccgactcgcc ctgcggccgc aggtcggcgc cgacgcggcg	660
15	gtgaagtcgg ggcgggggc ggcggacgcg atccggagc tgaccggcgg tgagggcgc	720
	acggcggtgt tcgacttcgt cggcgcggcag tcgacgatcg acacggcgcg caggtggc	780
	gcgatcgacg ggcacatctc ggtggtcggc atccatgcg gcgcacacgc caaggtcg	840
	ttcttcatga tcccgttcgg cgcgtccgtc gtgacccgt actggggcac gcggtcccg	900
	ctgatggacg tcgtggaccc ggcgggtcgc acatccacac cgagacgttc	960
20	accctcgacg agggacccac ggcctaccgg cggctacgcg agggcagcat cccggccgc	1020
	ggggtggtcg tcccggctg a	1041

<210> 17

<211> 1011

<212> ADN

25 <213> Pichia stipidis

<400> 17

	atgtctattc ctgctacaca atatggtttc gtcttcacca aaaaggacgg tttaaaaatt	60
30	cgcgagaaca tgcctgttct cgaacccaag gtcgaccaag tctgtctaa agtcgacgc	120
	ttaggattgt gtcactctgat cttcatgtcc atctacgacg gtcgactt tggtgacaat	180
	tacgtttatgg gccacaaat cggccggcacc attgtcaaga agggagccat ggtcgactt	240
	tgggaccta acacccgtgt tgcctgtttt ggtccaaact cctgtggca ttgtcaactt	300
	tgtcgactg gttttaaaaa tgattgtatc aatgtcgatc acgctgggtt tggatttaggt	360
35	aaaaacggag gtcaccacgca atatgttg gttgaaaagc ctgttaattt gttgtctatt	420
	ccagacaacg tcgagctgtc cgtacgcacg gccattaccg acgtttgtt gacccctac	480
	catgcccata gattagctgg ttttagatca ggcacgaagc tcttgcattt tggtgcttga	540
	ggattggag taaatgtat tcagattgtc aaagcattt gacgtcaatg cactgttatac	600
	gacaaaaaagc ccgaggctgt agacgtcgat aagagccatg ggcacatgc agtatattt	660
40	gcacttcctg aatcaaccac tccggaaat ttgcgtgtt ctatcgacta cgtttctact	720
	caaggcactt tcgacacttg tcaaaagtac gtcagatcta aggtaatat tggcccg	780
	gatggcccg ctccaagaat ttcttttaac ttgggagatt tggccctttag agaaattaat	840
	gtccttggta gttctgggg tacatcatcc gacttgaagg aatgtttcg tttggtcagc	900
	aaggcggaaag tcaaaccata ggtgactgtt gtcatttgcg agaatttgc tgaatacatt	960
45	gtcaagttac agaatttgcg ctacgaagg agacgtcgat tcaagccatg a	1011

<210> 18

<211> 1044

<212> ADN

50 <213> Gordona rubropertinctus

<400> 18

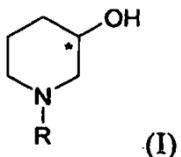
	atgaaggcca ttcagatcat ccagccggcc aaaccggccgg agtcgcgcg ggtcgagaaa	60
55	cccacccgcg tcccccggca ggtgttgcg aagggtacgg cagccggcgc ctgcattcg	120
	gacgacttcg tcctcaaccc gcccggaa ggattccctt atcccttgc gatgacgctc	180
	ggccacgaag gggccggcgt ggtcgccgag gtcgttaccg gcgtcaccgg catctccgag	240
	ggcacctcg tggccgtgt cggacgtcg ggttgcggcg tctgtactt ctgcgcggc	300
	ggcctggaga actactgcac ccgacccggc gaactcggca tcacccacc gggtctcg	360
	aacccggccg cgtacgtccgtc gtacgtcgat gttggacacg cacggcatct ggtgcgc	420
60	gtgtacccgtc accccgggtgc tgcgttccat ctcaccatcg ccggcctcac gccctaccac	480
	cgatcaaac cctcgcttc gaagctggc ggcggccacca cggcgttgcgat catcgagcc	540
	gtgtgtctcg ggcacgtcg gatccaactg ctgcgtccacc tgacccgtc ccgggtatc	600
	gctctcgatc tgacgtcgatc caagctcgat ttcgcgcgcg aggtcggggc tcacgagg	660
	gtgtctctccg acgcccgtgc cgtcgccgaa gtcggcaaga tcacccggca cgtatgtcg	720
65	accggccgtct tcgacttcgt cggcgtcgaa ctcacgtcgat acatcgat gggcgtcg	780
	gggaccatgg gtacgtggt gatcggtggc atcggtgaca tggcgccac ggcgaaggc	840

ES 2 619 338 T3

ggcttcttca cccagcccta cgaggtgtcg gtacgcgcgc cgtactgggg ggcgcgcgac	900
gaactcatcg aggtgctgga tctcgcacgc gatggggttc tcgaggtggc ggtcgaacga	960
ttctcactcg atgacggcgt cgaggcctac cggcgactgg ccgccaatga cttcgaggg	1020
cgagcagtgc tggtgcctga ctga	1044

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I)



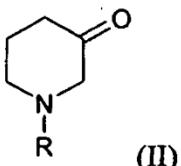
en la que el carbono quiral es la configuración (S);

R se selecciona entre hidrógeno y COR₁;

5 R₁ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆ y OR₂;

R₂ se selecciona entre alquilo C₁-C₆ y bencilo, estando dicho bencilo opcionalmente sustituido por uno o más grupos alquilo C₁-C₆;

- 10 comprendiendo dicho procedimiento reducir un compuesto de fórmula (II)



en la que R se define como anteriormente, con una oxidoreductasa de ID SEC. N° 1 en presencia de un cofactor y de un cosustrato que regenera dicho cofactor.

2. El procedimiento de la reivindicación 1 caracterizado porque R es COR₁.

3. El procedimiento de la reivindicación 2 caracterizado porque R₁ es OR₂.

15 4. El procedimiento de la reivindicación 3 caracterizado porque R es COOtBu.

5. El procedimiento de la reivindicación 3 caracterizado porque R es COObencilo.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado porque dicho cofactor se selecciona entre NADH y NAPDH.

20 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 caracterizado porque dicho cosustrato es un alcohol secundario.

8. El procedimiento de la reivindicación 7 caracterizado porque dicho alcohol secundario se selecciona entre 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-heptanol y 2-octanol.

9. El uso de una oxidoreductasa de ID SEC. N° 1 para la preparación de un compuesto de fórmula (I) a partir de un compuesto de fórmula (II) definido en las reivindicaciones 1 a 5.

25 10. El procedimiento o el uso de cualquier reivindicación precedente caracterizado porque dicha oxidoreductasa es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60% de identidad con la ID SEC. N° 1.

11. El uso de una oxidoreductasa de ID SEC. N° 1 para la preparación de un compuesto de fórmula (I) a partir de un compuesto de fórmula (II) definido en la reivindicación 5.