

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 225**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2010 PCT/EP2010/063558**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2011 WO11032990**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2010 E 10752833 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2478098**

54 Título: **Preparación de beta-aminoácidos**

30 Prioridad:

**15.09.2009 EP 09170364  
24.09.2009 US 245303 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.08.2017**

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)  
Carl-Bosch-Strasse 38  
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**SCHNEIDER, NINA;  
HAUER, BERNHARD;  
DITRICH, KLAUS;  
O`NEIL, MAEVE y  
TURNER, NICK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 628 225 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

Preparación de beta-aminoácidos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción biocatalítica de un precursor de un β-aminoácido a partir de un dihidrouracilo opcionalmente sustituido usando una hidantoinasa y/o una dihidropirimidinasas, un procedimiento para producir un β-aminoácido a partir de dicho precursor, una hidantoinasa y su uso en dicho procedimiento para la producción biocatalítica de un precursor de un β-aminoácido o de un β-aminoácido, y un procedimiento para obtener dicha hidantoinasa.

**Antecedentes de la técnica**

10 Los β-aminoácidos enantioméricamente puros son bloques de construcción valiosos para agentes terapéuticos novedosos que tienen una amplia gama de actividad biológica. Aunque se han desarrollado numerosas rutas biocatalíticas para su preparación, no ha surgido ningún procedimiento único que sea de aplicación universal. De manera similar, se han desarrollado pocas rutas quimio-catalíticas para conseguir β-aminoácidos, requiriendo la mayoría de ellas cantidades estequiométricas de auxiliares quirales.

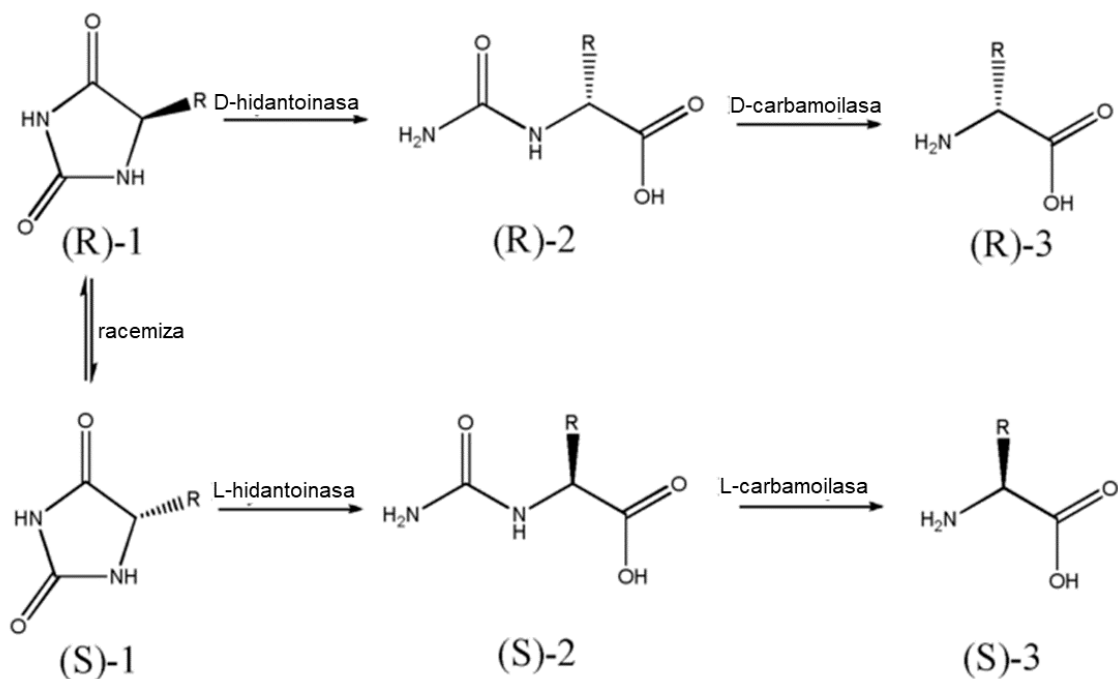
15 Las dihidropirimidinasas e hidantoinasas son posibles candidatos para la síntesis biocatalítica de aminoácidos o sus precursores. Gaebler y Keltch notificaron por primera vez actividades de escisión de las hidantoinasas en la década de 1920 (Gaebler, O. H.; Keltch, A. K. On the metabolism of hydantoins and hydantoic acid, 1926; Vol. 70). Eadie y col. sugirieron inicialmente en la década de 1950 que las hidantoinasas microbianas eran idénticas a la dihidropirimidinasas animal (Eadie, G.; Bernheim, F.; Bernheim, M. Journal of Biological Chemistry 181: 449-458, 1949). Las enzimas dihidropirimidinasas, aisladas de hígado de ternera y plantas, catalizan la hidrólisis de dihidrouracilo e dihidrotimina a N-carbamoil-β-alanina y N-carbamoil-2-metil-β-alanina, respectivamente. Estas enzimas también escinden hidantoína 20 ⑤-monosustituida en ⑤-N-carbamoil-aminoácido. La bibliografía reciente propone generalmente que la D-hidantoinasa procedente de fuentes microbianas se puede considerar como la contraparte de la dihidropirimidinasas animal, donde Nonaka y colaboradores, sugieren una relación evolutiva entre estas dos enzimas (Hamajima, N.; Matsuda, K.; Sakata, S.; Tamaki, N.; Sasaki, M.; Nonaka, M. Gene 180:157-163, 1996). Syldatky col. concluyen que las dihidropirimidinasas y las hidantoinasas no son necesariamente la misma enzima (Syldatky, C.; May, O.; Altenbuchner, J.; Mattes, R.; Siemann, M. Applied Microbiology and Biotechnology 51:293-309, 1999). Las diferentes enantioselectividades de las hidantoinasas se utilizan frecuentemente para agruparlas, según su especificidad, como D-, L-, o no específica (Ogawa, J.; Shimizu, S. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2:163-176, 1997).

30 Los problemas derivados del sistema de nomenclatura utilizado para las enzimas hidantoinasa y dihidropirimidinasas se agravan adicionalmente por el hecho que, frecuentemente, especialmente en revistas anteriores, los términos se utilizaban de forma indistinta. Las amidohidrolasas, también denominadas como amidasas cíclicas [E.C.3.5.2], son un grupo de más de 14 enzimas, que actúan todas ellas sobre anillos de amida cíclica y que contienen regiones muy conservadas y regiones de aminoácidos variantes (Kim, G. J.; Cheon, Y. H.; Kim, H. S. Biotechnology and Bioengineering 1998, 61, 1-13). Se incluyen en este grupo carboxilmetilhidantoinasa [E.C.3.5.2.4], alantoinasa 35 [E.C.3.5.2.5], 1-metilhidantoinasa [E.C.3.5.2.14] y carboxietil-hidantoinasa, todas ellas son técnicamente las únicas hidantoinasas, ya que sus sustratos son derivados de hidantoína naturales.

Otras enzimas comprendidas en el grupo más amplio de amidasas cíclicas incluyen dihidroorotasa [E.C.3.5.2.3] y dihidropirimidinasas [E.C.3.5.2.2], la última de estas se denomina normalmente como D-hidantoinasa, debido a su capacidad de hidrolizar derivados de hidantoína ⑤-monosustituida. Esta superfamilia de proteínas probablemente evolucionó en la tierra prehistórica, cuando se teorizaba que los aminoácidos de N-carbamilo habían sido los sintones originales de los péptidos prebióticos.

45 El uso de hidantoinasas para la hidrólisis enantioselectiva de mezclas racémicas de hidantoínas 5-sustituidas ①-1 y (S)-1 a sus correspondientes derivados de N-carbamilo ②-2 y (S)-2 está bien establecido (véase el Esquema 1 siguiente) y descrito en la bibliografía (Morin, Enzyme Microb. Technol. 15:208-214, 1993; Fan y Lee, Biochemical Engineering J. 8:157-164, 2001; Arcuri y col., J. Molecular Catalysis B 21:107-111, 2003; Arcuri y col., Amino Acids 19:477-482, 2000). Se ha desarrollado hasta la etapa en que los procedimientos comerciales funcionan ahora a una escala para la producción de D-③-aminoácidos ③-3 específicos usando esta tecnología. Un aspecto clave de estos procedimientos es que la racemización *in situ* del enantiómero (S)-1 que no ha reaccionado junto con la hidrólisis catalizada por carbamoylase de ②-2 conduce a una reacción de resolución cinética dinámica (DKR).

## Esquema 1



La resolución cinética se produce cuando una enzima convierte un enantiómero más rápido que el otro. Sin embargo, el rendimiento máximo de este tipo de reacciones es solamente del 50 %, y los productos deben separarse del material de partida. En una resolución cinética dinámica, los enantiómeros están racemizados, de forma que los enantiómeros (R)- y (S)- forman un equilibrio químico y se interconvierten con facilidad. Cuando el enantiómero que reacciona más rápidamente se convierte en el producto correspondiente, se vuelve a producir debido a la racemización, permitiendo de esta forma rendimientos de hasta el 100 %.

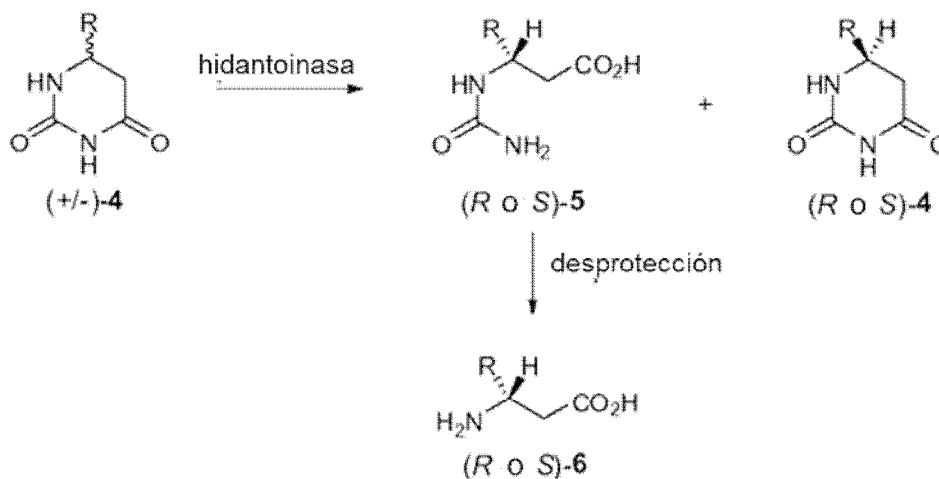
5

A diferencia de la hidrólisis enantioselectiva de las hidantoinas 5-sustituidas racémicas, la posibilidad de llevar a cabo la hidrólisis enantioselectiva de dihidouracilos 6 sustituidos (+/-)-4 (véase el esquema 2) a sus correspondientes derivados de N-carbamoilo (R o S)-5, como ruta para los β-aminoácidos (R o S)-6, ha recibido poca atención. Syldatk y col., en 1998 (May, O.; Siemann, M.; Pietzsch, M.; Kiess, M.; Mattes, R.; Syldatk, C. J. *Biotechnol.* 61:1-13, 1998) notificaron el uso de una hidantoinasa de *Arthrobacter aureescens* para la hidrólisis de dihidouracilo ((+/-)-4, en la que R significa H) y posteriormente en 2003 describieron en un póster que esta hidantoinasa se podría aplicar a la resolución de 6-fenildihidouracilo (6-PDHU, (+/-)-4, en la que R significa fenilo) aunque se observaron mala enantioselectividad y bajas velocidades de reacción con respecto a la 5-fenilhidantoína (R)-1 y (S)-1, respectivamente, en la que R significa Ph en el Esquema 1).

10

15

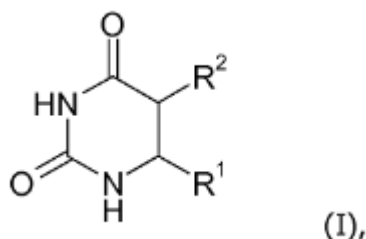
## Esquema 2



La solicitud de patente japonesa JP06261787 notificó tasas de exceso enantiomérico de hasta un 51 % para la hidrólisis de 6-PDHU usando IFO 12996 de *Pseudomonas putida*; se obtuvieron mejores selectividades (hasta un 93 % de exceso enantiomérico) con sustratos que contienen sustituyentes 6-alquilo. Claramente, existe la necesidad de mejorar los procedimientos para la producción biocatalítica de los precursores de  $\beta$ -aminoácidos o de los  $\beta$ -aminoácidos.

**Breve descripción de la invención**

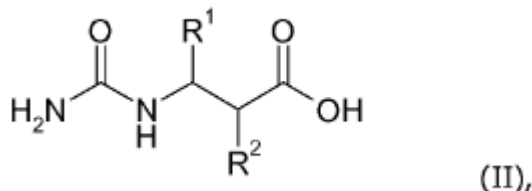
En un primer aspecto, el objeto de la presente invención se resolvió mediante un procedimiento para la producción biocatalítica, estereoespecífica, en particular enantioselectiva, de un precursor de  $\beta$ -aminoácidos, que comprende hacer reaccionar al menos un sustrato de la fórmula general (I)



en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> independientemente entre sí se seleccionan entre hidrógeno; un grupo alquilo inferior lineal o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo alqueno inferior lineal o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo alquilo cíclico opcionalmente sustituido; un grupo arilo monocíclico o policíclico opcionalmente sustituido; un grupo heteroarilo monocíclico o policíclico opcionalmente sustituido; un grupo alcoxi lineal o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo amino; un grupo alquilamino lineal o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo alquiltio lineal o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo acilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, un grupo carboxilo o un grupo aldehído;

en forma estereoisoméricamente pura, como por ejemplo un isómero @- o (S)-, o como una mezcla de estereoisómeros, como, por ejemplo, en forma de mezcla racémica, o una sal de dicho compuesto, como, por ejemplo, una sal de adición de ácido en presencia de al menos una enzima, que cataliza la escisión hidrolítica de una hidantoína y/o un anillo de dihidropirimidina, en particular, seleccionada entre una hidantoinasa y una dihidropirimidinasa, siendo más especialmente una hidantoinasa, en particular una enzima que tiene preferencia por un estereoisómero particular del

compuesto que se va a convertir; y opcionalmente en presencia de al menos una enzima que tiene la capacidad de interconvertir los estereoisómeros de dicho compuesto de fórmula (1), de forma que se produce un precursor de un  $\beta$ -aminoácido de la fórmula general (II) en la que  $R^1$  y  $R^2$  se identifican como anteriormente;

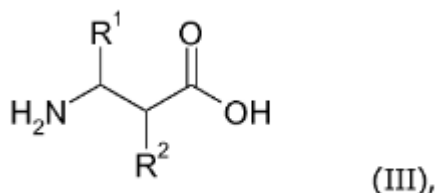


5 caracterizándose dicho procedimiento por que la al menos una enzima que cataliza la escisión hidrolítica de una hidantoína y/o un anillo de dihidropirimidina, en especial una hidantoinasa y/o dihidropirimidinasa, se obtiene de *Vigna angularis* y/o comprende al menos una secuencia parcial que tiene una identidad de aproximadamente un 60 al 100 % de al menos una de las siguientes secuencias parciales:

10 ITGPEGQRLAGP (SEQ ID NO:7)  
 IELGITGPEGQRLAGPTVL (SEQ ID NO:1)  
 IELGITGPEGQRLAGPVL (SEQ ID NO:2)  
 IELITGPEGQRLAGPTVL (SEQ ID NO:3)  
 IELITGPEGQRLAGPVL (SEQ ID NO:4)  
 15 EEIARARKSGQRVIGEPVAS (SEQ ID NO:5),

como por ejemplo, comprende al menos una secuencia parcial que tiene una identidad comprendida entre el 60 % y el 100 % de al menos una de las secuencias parciales de la SEQ ID NO: 5 y 7.

De acuerdo con una realización, el procedimiento comprende además una etapa adicional para convertir dicho precursor de  $\beta$ -aminoácido de fórmula (2) en el correspondiente  $\beta$ -aminoácido de la fórmula (III)



20 en la que  $R^1$  y  $R^2$  tienen el mismo significado que se ha definido anteriormente.

De acuerdo con una realización adicional, la conversión del precursor de  $\beta$ -aminoácido se produce a pH ácido, preferentemente en presencia de ácido nitroso, o en presencia de una carbamoilasa.

25 De acuerdo con una realización adicional, la al menos una hidantoinasa y/o dihidropirimidinasa (en especial las enzimas según E.C. 3.5.2.2) es una enzima que se puede obtener a partir de un organismo del género *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Vigna*, en especial *Vigna angularis*.

De acuerdo con una realización adicional,  $R^2$  es H y  $R^1$  es diferente de H en las fórmulas generales (I) a (III).

De acuerdo con una realización adicional,  $R^2$  es H y  $R^1$  es un grupo arilo opcionalmente sustituido en las fórmulas generales (I) a (III).

30 En especial, los compuestos de las fórmulas (II) y (III) y también de fórmula (I), en las que simplemente  $R^2$  es H, y  $R^1$  es diferente de H, están presentes preferentemente como el isómero (S) en una forma estereoisoméricamente pura, o en un exceso estereoisomérico (en particular, con un valor de ee mayor del 93 %, preferentemente en el intervalo de 95-99 %, o más del 99 %).

35 De acuerdo con una realización adicional, la reacción se lleva a cabo en una mezcla de reacción tamponada con Tris o tamponada con borato, preferentemente una mezcla de reacción tamponada con Tris.

De acuerdo con una realización adicional, la reacción se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 11,0, preferentemente a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 10,0, y especialmente preferida a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0.

De acuerdo con una realización adicional, la reacción se lleva a cabo en presencia de aproximadamente 1 % a aproximadamente un 20 % de dimetilsulfóxido, preferentemente en presencia de aproximadamente un 10 % de dimetilsulfóxido.

5 De acuerdo con una realización adicional, la reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 60 °C, preferentemente de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C, y en especial de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C.

De acuerdo con una realización adicional, la reacción se lleva a cabo desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 25 horas, preferentemente de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 10 horas, y en especial de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas.

10 De acuerdo con una realización adicional, el al menos un sustrato se selecciona entre una dihidrouracilo, que está monosustituido en la posición 5 o en la posición 6, en especial 6-fenildihidrouracilo, 6-(4-fluorofenil)-dihidrouracilo, 6-(4-clorofenil)-dihidrouracilo, 5-metildihidrouracilo y 6-metildihidrouracilo.

15 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un precursor de β-aminoácidos o un β-aminoácido que se puede obtener mediante un procedimiento de acuerdo con la invención para fabricar péptidos estables a la hidrólisis, principios farmacéuticamente activos, en especial antibióticos, antineoplásicos, antitrombóticos, insecticida antifúngico, antihelmíntico, antagonistas no peptídicos de la integrina, alcaloides y/o agentes citotóxicos.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de una hidantoinasa y/o una dihidropirimidinasa que comprende al menos una secuencia parcial que tiene una identidad comprendida entre el 60 por ciento y el 100 por ciento respecto a al menos una de las siguientes secuencias parciales:

20 ITGPEGQRLAGP (SEQ ID NO:7)  
 IELGITGPEGQRLAGPTVL (SEQ ID NO:1)  
 IELGITGPEGQRLAGPVL (SEQ ID NO:2)  
 IELITGPEGQRLAGPTVL (SEQ ID NO:3)  
 IELITGPEGQRLAGPVL (SEQ ID NO:4)

25 como por ejemplo al menos una de las secuencias parciales: SEQ ID NO: 5 y 7, para un procedimiento de acuerdo con la invención.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una hidantoinasa prácticamente pura, que contiene al menos una de las siguientes secuencias parciales que tienen una identidad de entre el 60 por ciento y el 100 por ciento, por ejemplo, un 100 por ciento respecto a al menos una de las siguientes secuencias parciales:

30 ITGPEGQRLAGP (SEQ ID NO:7)  
 IELGITGPEGQRLAGPTVL (SEQ ID NO:1)  
 IELGITGPEGQRLAGPVL (SEQ ID NO:2)  
 IELITGPEGQRLAGPTVL (SEQ ID NO:3)  
 IELITGPEGQRLAGPVL (SEQ ID NO:4)  
 35 EEIARARKSGQRVIGEPVAS (SEQ ID NO:5),

como por ejemplo al menos una de las secuencias parciales: SEQ ID NO: 5 y 7.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una hidantoinasa prácticamente pura, que se puede obtener preparando un extracto en bruto de material celular procedente de un organismo que expresa de forma natural o recombinante dicha actividad enzimática, y someter dicho extracto en bruto a las etapas de purificación secuencial de

40 a) cromatografía de intercambio iónico  
 b) cromatografía hidrófoba  
 c) filtración en gel  
 d) cromatografía de afinidad  
 45 e) intercambio aniónico  
 f) filtración en gel

Los aspectos adicionales de la presente invención se refieren a una hidantoinasa prácticamente pura, que comprende al menos una de la SEQ ID NO:1 a 5 y 7 y/o que se aísla de acuerdo con el procedimiento anteriormente mencionado. Preferentemente, la hidantoinasa se obtiene de un organismo del género *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Vigna*, en especial *Vigna angularis*.

50 Un aspecto adicional se refiere a una hidantoinasa, que comprende al menos una de la SEQ ID NO: 1 a 5 y 7, que se obtiene de *Vigna angularis*, en particular según un procedimiento que comprende sustancialmente las etapas de purificación anteriores de acuerdo con el procedimiento anteriormente mencionado, y que muestra después de un SDS PAGE, en especial en condiciones reductoras, una banda de proteína a 55±10, 55±5 o 55±2 o a aproximadamente 55

kD.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de una hidantoinasa anteriormente mencionada para un procedimiento de producción biocatalítica de un precursor de  $\beta$ -aminoácidos o un  $\beta$ -aminoácido de acuerdo con la invención.

- 5 La hidantoinasa anteriormente mencionada puede ser, en especial, una hidantoinasa de un organismo del género *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Vigna*, en especial *Vigna angularis*.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de cualquiera de las hidantoinasas anteriormente mencionadas en un procedimiento de acuerdo con la invención.

### **Descripción de las figuras**

- 10 En lo sucesivo, la presente invención se describe de una forma más detallada, en la que se puede hacer referencia a las figuras.

La Fig. 1 muestra un gel SDS PAGE de la hidantoinasa purificada a partir de *Vigna angularis*.

La Fig. 2 muestra dos formas ilustrativas de sintetizar dihidouracilos 6 sustituidos.

- 15 La Fig. 3 muestra la separación de N-carbamoil- $\beta$ -fenilalanina (NCBPA), 6-fenildihidouracilo (6-PDHU) y enzima mediante cromatografía de intercambio aniónico (columna DEAE).

La Fig. 4. muestra los resultados de una HPLC quiral en fase invertida después de la hidrólisis catalizada por hidantoinasa de la 6-PDHU.

La Fig. 5 muestra las velocidades de conversión con el tiempo de 6-PDHU al derivado de N-carbamóilo (NCBPA) y las correspondientes tasas de exceso enantiomérico.

- 20 La Fig. 6 muestra la ciclación de N-carbamoil- $\beta$ -fenilalanina en ausencia o presencia de hidantoinasa.

La Fig. 7 muestra la dependencia del pH de la hidrólisis química de 6-DPHU en tampón Tris desprovisto de la hidantoinasa.

La Fig. 8 muestra la dependencia del pH de la conversión enzimática de la 6-DPHU mediada por hidantoinasa.

- 25 La Fig. 9 muestra las tasas de conversión de la hidantoinasa en diferentes combinaciones de valor de pH/tampón con el tiempo.

La Fig. 10 muestra la reacción catalizada por D-hidantoinasa procedente de *Vigna angularis* (Sigma).

La Fig. 11 muestra la influencia de codisolventes orgánicos sobre la conversión de la 6-PDHU catalizada por hidantoinasa.

- 30 La Fig. 12 muestra la influencia de diferentes concentraciones de hidantoinasa sobre la formación de producto y el exceso enantiomérico.

La Fig. 13 muestra la producción de NCBPA en reacciones de 25 ml.

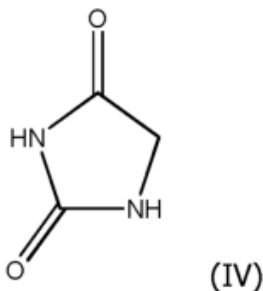
La Fig. 14 muestra el exceso enantiomérico de S-NCBPA en reacciones de 25 ml.

### **Descripción detallada de la invención**

#### **A. Definiciones**

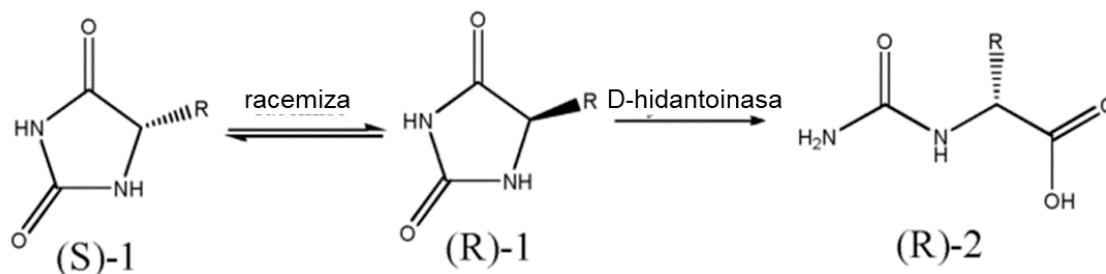
- 35 En el contexto de la invención, "una enzima que cataliza la escisión hidrolítica de una hidantoína y/o un anillo de dihidropirimidina", como una hidantoína sustituida y/o un anillo de dihidropirimidina sustituido, como, por ejemplo, 5-fenilhidantoína y 6-fenildihidouracilo, debe mostrar la capacidad de catalizar la escisión hidrolítica de al menos un compuesto de fórmula (I) para formar un compuesto de fórmula (II). En especial, dicha enzima también se puede denominar como hidantoinasa y/o dihidropirimidinasa, en la que una enzima, cuyo sustrato natural es un anillo de hidantoína, preferentemente se denominaría como una hidantoinasa, y una enzima, cuyo sustrato natural es un anillo de dihidouracilo, preferentemente se denominaría como una dihidropirimidinasa.
- 40

En el contexto de la presente invención, las dihidropirimidinasas se caracterizan como enzimas que son capaces de hidrolizar dihidropirimidinas y, además, de hidrolizar hidantoína (como se muestra en la fórmula IV) y de resolver las hidantoínas ( $\pm$ )-5-monosustituidas como se muestra en el Esquema 3.



45

## Esquema 3



Inversamente, las hidantoinasas suelen mostrar poca actividad hidrolítica respecto a las dihidropirimidinas, pero pueden hidrolizar hidantoína e hidantoínas ( $\pm$ )-5-monosustituidas. Los ensayos adecuados para hidrolizar hidantoína o dihidropirimidina y, en consecuencia, para definir adicionalmente las enzimas aplicables en el procedimiento de la invención, se describen, por ejemplo, en el Ejemplo 1.

El término “aproximadamente” indica la posibilidad de una variación de  $\pm 25\%$  del valor indicado, en especial  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$  o  $\pm 4\%$  o  $\pm 3\%$  o  $\pm 2\%$  o  $\pm 1\%$ .

En el contexto de la presente invención, enantioselectividad significa que el exceso enantiomérico “ee” del enantiómero S, que se expresa en porcentaje (%) y se calcula sobre la base de las respectivas concentraciones del enantiómero S y el enantiómero R de la siguiente forma:

$$ee (\%) = [(\text{enantiómero S} - \text{enantiómero R}) / (\text{enantiómero S} + \text{enantiómero R})] \times 100,$$

es al menos un 50 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 %, y en especial más de un 93 %, en especial al menos un 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o 100 %.

Como se usa en el presente documento, una proteína o enzima “prácticamente pura” significa que la proteína purificada deseada está prácticamente exenta (por ejemplo, más de un 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 99,9 % (en peso seco) constituye dicha proteína) de componentes celulares contaminantes, como se evidencia por una sola banda después de la electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La expresión “prácticamente pura” se usa adicionalmente para describir una molécula que es homogénea según una o más características de homogeneidad o pureza usadas por el experto en la técnica. Por ejemplo, una proteína prácticamente pura mostrará características constantes y reproducibles según las desviaciones experimentales habituales para parámetros tales como los siguientes: peso molecular, migración cromatográfica, composición de aminoácidos, secuencia de aminoácidos, extremo N bloqueado o no bloqueado, perfil de elución de HPLC, actividad biológica, y otros parámetros de ese tipo. El término, sin embargo, no pretende excluir mezclas artificiales o sintéticas de dicha proteína con otros compuestos. Además, no se pretende que el término excluya proteínas de fusión de dicha proteína opcionalmente aislada a partir de un hospedador recombinante.

### **B. Sustratos para el procedimiento de acuerdo con la invención**

Los restos  $R^1$  y/o  $R^2$  de un sustrato de acuerdo con la fórmula general (1) se puede seleccionar entre grupos alquilo inferior lineales o ramificados, que opcionalmente pueden estar sustituidos en una o más posiciones. Los restos  $R^1$  y  $R^2$  pueden ser, en particular, grupos que comprenden grupos alquilos de cadena lineal o ramificada que contienen de 1 a 10 átomos de carbono, en particular 2 a 6 átomos de carbono, tal como un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo i-propilo o n-propilo, un grupo sec-butilo o terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo 2-metil-butilo, un grupo n-hexilo, un grupo heptilo, un grupo octilo, un grupo nonilo, un grupo decilo. Los ejemplos de grupos alquilo ramificados incluyen grupos isopropilo, isobutilo, isopentilo, 2,2-dimetilpropilo, isohexilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, isoheptilo, 2-etilbutilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetil-pentilo, 2,4-dimetilpentilo, 2,2,3-trimetilbutilo, isoocilo, 3-metilheptilo, 4-metilheptilo, 2,2-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 2,2,3-trimetilpentilo, 2,2,4-trimetilpentilo, 2,2,5-trimetilpentilo e isononilo.

Los restos  $R^1$  y/o  $R^2$  de un sustrato de acuerdo con la fórmula general (1) se puede seleccionar adicionalmente entre grupos alqueno inferior lineales o ramificados, que pueden estar sustituidos en una o más posiciones. Los ejemplos comprenden análogos insaturados de grupos alquilo inferior, que comprenden uno o más dobles enlaces carbono-carbono en cualquier posición posible de la cadena de carbono. Los ejemplos son grupos vinilo, grupos alilo (2-propenilo), grupos but-1-enilo, grupos cis-but-2-enilo, grupos trans-but-2-enilo, grupos pent-1-enilo, grupos cis-pent-2-enilo, grupos trans-pent-2-enilo, grupos 2-metil-but-1-enilo, grupos 2-metil-but-2-enilo, grupos 3-metil-but-1-enilo, grupos hex-1-enilo, grupos hex-2-enilo en sus isómeros tanto cis como trans, grupos hex-3-enilo,



grupos 2-metil-pent-1-enilo, grupos 2-metil-pent-2-enilo, grupos 3-metil-pent-2-enilo, grupos 4-metil-pent-1-enilo, grupos 4-metil-pent-2-enilo, grupos 2-etil-but-1-enilo, grupos 2,3-dimetil-but-1-enilo, grupos 2,3-dimetil-but-2-enilo, grupos 3,3-dimetil-but-1-enilo.

5 Los restos  $R^1$  y/o  $R^2$  de un sustrato de acuerdo con la fórmula general (1) se pueden seleccionar adicionalmente entre grupos alquilo cíclicos que tienen una cadena principal cíclica de carbono, en particular compuestos que tienen una  
 10 cadena principal cíclica de carbono de 3 a 10 átomos de carbono, es decir, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo. Adicionalmente, se incluyen análogos de grupos alquilo cíclicos monoinsaturados o poliinsaturados, tales como ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclopentadienilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclohexadienilo, y cicloheptadienilo. Los grupos alquilo cíclicos o sus análogos monoinsaturados o  
 15 poliinsaturados pueden estar sustituidos en una o más posiciones. Los restos  $R^1$  and  $R^2$  de un sustrato de acuerdo con la fórmula general (1) se pueden seleccionar adicionalmente entre grupos arilo monocíclicos o policíclicos, que pueden estar sustituidos en una o más posiciones. Los ejemplos de grupos arilo son grupos aromáticos monocíclicos o policíclicos (en particular dicíclicos), en particular grupos fenilo o naftilo unidos mediante cualquier átomo de carbono del anillo, por ejemplo 1-naftilo y 2-naftilo.

15 Los restos  $R^1$  y/o  $R^2$  de un sustrato de acuerdo con la fórmula general (1) se pueden seleccionar adicionalmente entre grupos heteroarilo monocíclicos o policíclicos, que pueden estar sustituidos en una o más posiciones. Por ejemplo, los grupos heteroarilo pueden derivarse de pirrolidina, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, piperidina, tetrahidropirano, tetrahidropirano, piridina, morfolina, pirrol, furano, tiofeno, pirazol, imidazol, oxazol, tioazol, pirano, pirimidina, piridazina y pirazina. Los ejemplos de grupos dicíclicos son condensados de los grupos arilo o grupos heteroarilo  
 20 anteriormente mencionados, o sus correspondientes derivados, con un grupo arilo adicional, un grupo heteroarilo o sus correspondientes derivados, tales como grupos derivados de cumarol, indol, quinolina, purina y naftaleno. Los grupos heteroarilo monocíclicos o policíclicos se pueden sustituir en una o más posiciones, y pueden estar unidos al correspondiente átomo de carbono en la fórmula general (1) mediante cualquier átomo del anillo, preferentemente mediante un átomo de carbono del anillo. Los ejemplos de grupos adecuados incluyen 2-tienilo, 3-tienilo, grupos  
 25 2-furanilo, grupos 3-furanilo, grupos 2-piridilo, grupos 3-piridilo, grupos 4-piridilo, grupos 2-tiazolilo, grupos 4-tiazolilo, grupos 5-tiazolilo, grupos 4-metil-2-tienilo, grupos 3-etil-2-tienilo, grupos 2-metil-2-tienilo, grupos 4-propil-3-tienilo, grupos 5-butil-2-tienilo, grupos 4-metil-3-tienilo, grupos 3-metil-2-tienilo<sup>2-</sup>, grupos 3-cloro-2-tienilo, grupos 4-bromo-3-tienilo, 2-yodo-3-tienilo, 5-yodo-3-tienilo, grupos 4-flouro-2-tienilo, grupos 2-bromo-3-tienilo y grupos 4-cloro-2-tienilo.

30 Los restos  $R^1$  y/o  $R^2$  del sustrato de acuerdo con la fórmula general (1) se puede seleccionar adicionalmente entre grupos alcoxi lineales o ramificados, que opcionalmente pueden estar sustituidos en una o más posiciones. En este caso, el compuesto de la fórmula general (1) está unido a través de un átomo de oxígeno con un grupo de acuerdo con cualquiera de las definiciones anteriormente mencionadas, por ejemplo, un grupo alquilo inferior lineal o ramificado  
 35 opcionalmente sustituido; un grupo alqueno inferior lineal o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo alquilo cíclico opcionalmente sustituido; un grupo arilo monocíclico o policíclico opcionalmente sustituido (que también se puede denominar un grupo ariloxi); un grupo heteroarilo monocíclico o policíclico o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido. Los ejemplos de grupos alcoxi son el grupo metoxi ( $-O-CH_3$ ), el grupo etoxi ( $-O-C_2H_5$ ) y los grupos de la fórmula general  $-O-C_nH_{2n+1}$ , en la que n es un número entero de 1 a 10.

40 Los restos  $R^1$  y/o  $R^2$  del sustrato de acuerdo con la fórmula general (1) se pueden seleccionar adicionalmente entre un grupo amino y grupos alquilamino lineales o ramificados, que opcionalmente pueden estar sustituidos en una o más posiciones. En este caso, el compuesto de la fórmula general (1) está unido mediante un átomo de nitrógeno, que puede estar unido por sí mismo a dos átomos de hidrógeno (amina primaria, grupo amino), un hidrógeno y un resto orgánico (amina secundaria,  $-NHR^1$ ), o dos restos orgánicos (amina terciaria,  $-NR^1R^2$ ), en la que los restos orgánicos  
 45  $R^1$  y  $R^2$  independientemente entre sí se pueden seleccionar entre cualquier grupo de acuerdo con las definiciones anteriormente mencionadas para grupos alquilo inferior, lineales o ramificados, opcionalmente sustituidos; grupos alqueno inferior lineales o ramificados opcionalmente sustituidos; grupo alquilo cíclico opcionalmente sustituido; grupos arilo monocíclicos o policíclicos opcionalmente sustituidos, y un grupo heteroarilo monocíclico o policíclico o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido. Los ejemplos de grupos amino son el grupo amino primario ( $-NH_2$ ). Los ejemplos de grupos amino secundario son el grupo metilamino ( $-NH-CH_3$ ), el grupo etilamino ( $-NH-C_2H_5$ ) y los grupos  
 50 de la fórmula general  $-NH-C_nH_{2n+1}$ , en la que n es preferentemente un número entero entre 1 y 10. Los ejemplos de grupos terciarios son los grupos dimetilamino ( $-N(CH_3)_2$ ), el grupo dietilamino ( $-N(CH_2CH_3)_2$ ), el grupo dipropilamino ( $-N(CH_2CH_2CH_3)_2$ ), el grupo dibutilamino ( $-N(CH_2CH_2CH_2CH_3)_2$ ), el grupo metiletilamino, y el grupo metilpropilamino.

55 Los restos  $R^1$  y/o  $R^2$  del sustrato de acuerdo con la fórmula general (1) se puede seleccionar adicionalmente entre grupos alquiltio lineales o ramificados, que opcionalmente pueden estar sustituidos en una o más posiciones. En este caso, el compuesto de la fórmula general (1) está unido a través de un átomo un azufre con un grupo de acuerdo con cualquiera de las definiciones anteriormente mencionadas, por ejemplo, un grupo alquilo inferior lineal o ramificado  
 60 opcionalmente sustituido; un grupo alqueno inferior lineal o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo alquilo cíclico opcionalmente sustituido; un grupo arilo monocíclico o policíclico opcionalmente sustituido (que se puede denominar un grupo tioarilo); un grupo heteroarilo monocíclico o policíclico o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido. Los ejemplos de grupos alquiltio son el grupo tiometilo ( $-S-CH_3$ ), el grupo tioetilo ( $-S-C_2H_5$ ) y los grupos de la fórmula general  $-S-C_nH_{2n+1}$ , en la que n es un número entero de 1 a 10.

Los restos R<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup> del sustrato de acuerdo con la fórmula general (1) se pueden seleccionar adicionalmente entre grupos acilo lineales o ramificados, que opcionalmente pueden estar sustituidos en una o más posiciones. Los grupos acilo tienen la fórmula general -C-C(O)-R, en la que R puede ser cualquier grupo alquilo, grupo arilo o grupo heteroarilo como se define en el presente documento. Cuando R es hidrógeno u OH, el grupo -C(O)-R es un grupo aldehído o un grupo carboxilo, respectivamente.

Los grupos anteriormente mencionados pueden estar opcionalmente sustituidos en una o más posiciones. Los átomos de hidrógeno de los átomos de carbono pueden, por ejemplo, independientemente entre sí, estar sustituidos por otros compuestos de carbono, tales como grupos alquilo o alqueno inferior lineales o ramificados, grupos alquilo cíclicos, grupo arilo o heteroarilo, halógeno, tal como flúor, cloro, bromo y yodo, o heteroátomos o compuestos que contienen heteroátomos. Los ejemplos de compuestos que contienen heteroátomos son -OH, -SH, -NO<sub>2</sub>, -NO<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>, grupos -SO<sub>4</sub>, grupos alcoxi y NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, en la que R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> independientemente entre sí representan H, un grupo metilo o un grupo etilo.

En realizaciones particulares del procedimiento de acuerdo con la invención, R<sup>2</sup> es H. En realizaciones adicionales preferidas, R<sup>2</sup> es H, y R<sup>1</sup> se selecciona en paralelo entre H, un grupo metilo, un grupo arilo opcionalmente sustituido, en particular un grupo arilo monocíclico opcionalmente sustituido. Los ejemplos preferidos son un grupo fenilo, un grupo fenilo monosustituido o polisustituido, en los que los sustituyentes, independientemente entre sí, se pueden seleccionar entre, por ejemplo, un halógeno, metilo, etilo, -OH, -NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, y -SO<sub>3</sub>H. El grupo fenilo sustituido puede ser, por ejemplo, 2-F-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 3-F-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-F-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 2-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 3-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 2,3-F-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>, 2,4-F-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>, 2,5-F-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>, 2,3-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>, 2,4-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>, y 2,5-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>.

En otras realizaciones particulares, R<sup>2</sup> es H y R<sup>1</sup> se selecciona el grupo que comprende H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-C(NH)NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>SH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>(C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), en la que C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> denota un grupo imidazol, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>(C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N), en la que C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N denota un resto indol, -CH<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)OH, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-SeH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SeCH<sub>3</sub> (Selenometionina), -(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), P-F-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, y P-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.

### **C. Condiciones de procedimiento**

La al menos una enzima, seleccionada entre una hidantoinasa y una dihidropirimidinasas, que está presente durante el procedimiento para producir un precursor de un β-aminoácido, puede estar presente en las células vivas para producir de forma natural o recombinante la enzima o enzimas, en células recogidas, en células muertas, en células permeabilizadas, en extractos celulares en bruto, en extractos purificados, o en una forma prácticamente pura o completamente pura. La al menos una enzima puede estar presente en solución, o una enzima puede estar inmovilizada en un transportador. Una o varias enzimas pueden estar simultáneamente presentes en forma soluble e inmovilizada.

El procedimiento de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo en reactores comunes, que son conocidos por los expertos en la materia, y en diferentes intervalos de escala, por ejemplo, a una escala de laboratorio (de pocos mililitros a docenas de litros de volumen de reacción) a una escala industrial (varios litros a miles de metros cúbicos de volumen de reacción). Si la hidantoinasa y/o dihidropirimidinasas se utiliza en una forma encapsulada en células no vivas opcionalmente permeabilizadas, en la forma de un extracto celular más o menos purificado o en una forma purificada, se puede usar un reactor químico. El reactor químico permite normalmente controlar la cantidad de la al menos una enzima, la cantidad del al menos un sustrato, el pH, la temperatura y la circulación del medio de reacción. Cuando la al menos una enzima está presente en las células vivas, el procedimiento será una fermentación. En este caso, la producción biocatalítica tendrá lugar en un biorreactor (fermentador), donde los parámetros necesarios para unas condiciones de vida adecuadas para las células vivas (por ejemplo, medio de cultivo con nutrientes, temperatura, aireación, presencia o ausencia de oxígeno u otros gases, antibióticos) se pueden controlar. Los expertos en la materia están familiarizados con los reactores químicos o biorreactores, por ejemplo, en procedimientos para escalar procedimientos químicos o biotecnológicos en desde la escala de laboratorio hasta la escala industrial, o para optimizar parámetros del procedimiento, que también se han descrito ampliamente en la bibliografía (para los procedimientos biotecnológicos, véase por ejemplo Crueger und Crueger, Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie, 2. Ed., R. Oldenbourg Verlag, Múnich, Viena, 1984).

Las células que contienen la al menos una hidantoinasa y/o dihidropirimidinasas se pueden permeabilizar por medios físicos o mecánicos, tales como ultrasonidos o pulsos de radiofrecuencia, prensas francesas, o procedimientos químicos, tales como medios hipotónicos, enzimas líticas y detergentes presente en el medio, o una combinación de dichos procedimientos. Los ejemplos de detergentes son digitonina, n-dodecilmaltósido, octilglicósido, Triton® X-100, Tween® 20, desoxicolato, CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato), Nonidet® P40 (Etilfenolpoli(etilenglicoléter)). Si la al menos una enzima está inmovilizada, está unida a un transportador inerte. Los materiales transportadores adecuados son conocidos en la técnica y, por ejemplo, se divulgan en los documentos EP-A-1149849, EP-A-1 069 183 y DE-OS 100193773 así como en las referencias de la bibliografía citada en dichos documentos (todos ellos están específicamente incorporados en lo que respecta a los materiales transportadores). Los ejemplos de materiales transportadores adecuados son arcillas, minerales arcillosos tales como caolinita, tierra de diatomeas, perlita, sílice, alúmina, carbonato de sodio, carbonato de calcio, polvo de celulosa, materiales intercambiadores de aniones, polímeros sintéticos, tales como poliestireno, resinas acrílicas, resinas de

fenol-formaldehído, poliuretanos y poliolefinas, tales como polietileno y polipropileno. Para preparar enzimas unidas a transportadores, los materiales transportadores normalmente se utilizan en la forma de polvos finos, en la que se prefieren formas porosas. El tamaño de partícula del material transportador no suele superar los 5 mm, especialmente 2 mm. En el caso de que la al menos una enzima esté presente en una preparación de células completas, dicha preparación de células completas puede estar presente en una forma libre o inmovilizada. Los materiales transportadores adecuados son por ejemplo Ca-alginato o carragenato. Tanto las enzimas como las células pueden estar directamente unidas mediante glutaraldehído. Se conoce en la materia una amplia gama de procedimientos de inmovilización (por ejemplo, J. Lalonde y A. Margolin "Immobilization of Enzymes" en K. Drauz und H. Waldmann, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2002, Vol. III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim).

#### 10 **D. Enzimas**

La al menos una enzima a utilizar en el procedimiento de producción biocatalítica de un precursor de un  $\beta$ -aminoácido, en particular, para la producción enantioselectiva biocatalítica de un precursor de un  $\beta$ -aminoácido, se selecciona entre una hidantoinasa y una dihidropirimidinasa, preferentemente cualquier hidantoinasa o cualquier dihidropirimidinasa que se puede obtener a partir de *Vigna angularis*. Durante la producción biocatalítica de un precursor de un  $\beta$ -aminoácido, una o varias hidantoinasas, una o varias dihidropirimidinastas, o cualquier combinación de las mismas, puede estar presente. Preferentemente, al menos una hidantoinasa está presente. La al menos una enzima es preferentemente un enzima enantioselectiva, preferentemente una D-dihidropirimidinasa y/o una D-hidantoinasa. En especial, la enzima es una D-hidantoinasa. La al menos una enzima es preferentemente capaz de producir el correspondiente (S)-N-carbamoil- $\beta$ -aminoácido hidrolizando un dihidouracilo ( $\pm$ )-6-monosustituido, por ejemplo, una (S)-N-carbamoil- $\beta$ -fenilalanina a partir de ( $\pm$ )-6-fenil dihidouracilo.

Si se va a purificar la al menos una enzima, se pueden usar procedimientos habituales conocidos por los expertos en la materia. Tras la rotura de las células, los extractos en bruto se pueden obtener mediante centrifugación o filtración, en particular para la separación de proteínas a partir de residuos celulares, fragmentos de membrana o células fantasma. Las etapas de purificación adicionales o alternativas comprenden filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, usando Q-Sepharose), cromatografía hidrófoba, cromatografía en fase invertida, ultrafiltración, cristalización, desalado, diálisis, electroforesis en gel nativo, inmunoprecipitación, y cromatografía de afinidad. Los procedimientos adecuados se describen por ejemplo en Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlín, Nueva York, o en Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, Nueva York, Heidelberg, Berlín. De acuerdo con realizaciones preferidas, la al menos una enzima está presente en al menos una forma parcialmente purificada o en una forma prácticamente purificada. En el contexto de la presente invención, las enzimas están en una forma esencialmente purificada, si otras proteínas normalmente presentes en una célula o un organismo usado como fuente para la enzima no se pueden detectar claramente mediante tinción de Coomassie después de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS PAGE), pero se puede seguir discerniendo como bandas en un gel SDS PAGE después de tinción con plata. Las enzimas están presentes en forma totalmente pura si bandas si no se pueden discernir, o solo se disciernen levemente, bandas de otras proteínas tras el SDS PAGE y posterior tinción con plata. El aislamiento de las hidantoinasas se ha descrito en la bibliografía (por ejemplo, Morin, Enzyme Microb. Technol. 15:208-214, 1993; Fan y Lee, Biochemical Engineering J. 8:157-164, 2001). Los procedimientos de extracción preferidos incluyen al menos tres, en particular al menos cuatro, al menos cinco, o todas las siguientes etapas, preferentemente a realizar en el siguiente orden secuencial:

- 40 a) cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, usando una cromatografía en columna Q-Sepharose FF)
- b) cromatografía hidrófoba (por ejemplo, usando una columna de fenil sefarosa)
- c) filtración en gel (por ejemplo, usando una columna Superdex Prep Grade 200 Gel Filtration)
- d) cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando una cromatografía en columna de afinidad Blue HiTrap 5 ml)
- 45 e) cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, usando una columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5), y
- f) filtración en gel (por ejemplo, usando una columna de filtración en gel Superose 6 calidad preparativa).

Las fuentes adecuadas de la al menos una hidantoinasa y/o hidropirimidinasa son microorganismos y organismos superiores, tales como bacterias y archeobacterias, levaduras, hongos, plantas y animales, hongos, levaduras, bacterias y archeobacterias. Los ejemplos de bacterias son *Acidovorax* (por ejemplo, *A. avenae*); *Agrobacterium* (por ejemplo, *A. radiobacter*, *A. tumefaciens*, *A. sp* IP 1-671, *A. tumefaciens* RU-OR, y *A. tumefaciens* NRRL B 11291); *Arthrobacter* (por ejemplo, *A. crystallopoietes* AM2), *Aurantimonas* (por ejemplo, *A. sp.* SI85-9<sup>81</sup>); *Brucella* (por ejemplo, *B. canis*, *B. ceti*, *B. ovis*, *B. pinnipedialis*, *B. suis*); *Burckholderia* (por ejemplo, *B. sp.* H160, *B. phymatum*, *B. phytofirmans*); *Dickeya* (por ejemplo, *D. dadantii*); *Jannaschia* (por ejemplo, *J. sp.* CCS1); *Mesorhizobium* (por ejemplo, *M. loti*); *Oceanicola* (por ejemplo, *O. batsensis*); *Ochrobactrum* (por ejemplo, *O. intermedium*, *O. sp.* G21, *O. anthropi*); *Polaromonas* (por ejemplo, *P. naphthalenivorans*), *Reinekea* (por ejemplo, *R. sp.* MED297); *Rhizobium* (por ejemplo, *R. leguminosarum*); *Verminephrobacter* (por ejemplo, *V. eiseniae*); *Rhodobacter* (por ejemplo, *R. sphaeroides*); *Vibrio* (por ejemplo, *V. cholerae*); *Fulvimarina* (por ejemplo, *F. pelagi*). Un ejemplo de un organismo metazoico simple es *Trichoplax adherens*, y los ejemplos de plantas inferiores y superiores son *Arabidopsis* (por ejemplo, *A. thaliana*); *Bradyrhizobium* (por ejemplo, *B. sp.* ORS278; *B. japonicum*, *B. sp.* BTAil); *Shlamydomonas* (por ejemplo, *C. reinhardtii*); *Glicina* (*Glycine max*); *Medicago* (*M. trunculata*); *Oryza* (por ejemplo, *O. sativa*); *Physcomitrella* (por ejemplo, *P. patens*); *Picea* (por ejemplo, *P. sitchensis*); *Populus* (por ejemplo, *P. trichocarpa*); *Ricinus* (por

ejemplo, *R. communis*); *Sorghum* (por ejemplo, *S. bicolor*); *Vitis* (por ejemplo, *V. vinifera*); *Zea* (por ejemplo, *Zea mays*). Los ejemplos de animales son *Gallus* (por ejemplo, *G. gailuis*); *Homo sapiens*; Macaca (por ejemplo, *M. mulatta*); *Pan* (por ejemplo, *P. troglodytes*), y *Xenopus* (por ejemplo, *X. laevis*, *X. tropicalis*).

5 Las fuentes especialmente preferidas de al menos una hidantoinasa y/o dihidropirimidinasa son los géneros *Vigna* (en particular *Vigna angularis*), *Agrobacterium*, *Arthrobacter* y *Pseudomonas* (en particular *Burckholderia* según la taxonomía reciente). La hidantoinasa procedente de *Vigna angularis* se puede obtener comercialmente de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.).

10 Se prefieren especialmente las hidantoinasas y/o dihidropirimidasas, que comprenden al menos una secuencia parcial que tienen una identidad entre un 60 por ciento y un 100 por ciento de al menos una de las siguientes secuencias parciales:

15 IELGITGPEGQRLAGPTVL (SEQ ID NO:1)  
 IELGITGPEGQRLAGPVL (SEQ ID NO:2)  
 IELITGPEGQRLAGPTVL (SEQ ID NO:3)  
 IELITGPEGQRLAGPVL (SEQ ID NO:4)  
 EEIARARKSGQRVIGEPVAS (SEQ ID NO:5)  
 ITGPEGQRLAGP (SEQ ID NO:7).

20 El grado de identidad con cualquiera de la SEQ ID NO:1-5 o 7 puede ser al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos un 85 % o al menos un 90 %. En especial, el grado de identidad con cualquiera de la SEQ ID NO: 1-5 o 7 puede ser al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %. En especial, cualquiera de la SEQ ID NO:1-5 o 7 puede ser idéntica a una secuencia comprendida en una hidantoinasa y/o dihidropirimidinasa (100 % de identidad). El carácter hidantoinasa y/o dihidropirimidinasa de cualquier proteína dada se puede determinar fácilmente mediante los ensayos de hidantoinasa y/o dihidropirimidinasa descritos en la presente memoria.

25 Además, o como alternativa a las hidantoinasas y/o dihidropirimidasas presentes en los organismos o microorganismos o extraídas de los mismos, se pueden usar equivalentes funcionales de dichas hidantoinasas y/o dihidropirimidasas.

30 Los equivalentes funcionales son mutantes que difieren en al menos una posición de la secuencia de aminoácidos natural, reteniendo aún al menos parcialmente la actividad enzimática de una hidantoinasa y/o dihidropirimidinasa. Los equivalentes funcionales pueden comprender uno o más, como por ejemplo de 1 a 20, 1 a 15 o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 adiciones de aminoácidos, sustituciones, deleciones y/o inversiones, que se pueden producir en cualquier posición de la secuencia, siempre que no eliminen la actividad catalítica. Los equivalentes funcionales pueden ser también enzimas con una velocidad de reacción alterada del sustrato y/o producto, una afinidad alterada por el sustrato y/o producto, y/o selectividad alterada de sustratos particulares (por ejemplo, sustratos aceptores equivalentes  
 35 funcionales con grupos R<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup> más voluminosos o hidrófobos. Se relacionan a continuación ejemplos no limitantes de sustituciones de alta probabilidad con al menos una retención parcial de la actividad enzimática:

<b>resto de aminoácido original</b>	<b>posible sustitución por</b>
Ala	Ser; Gly; Val
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Los equivalentes funcionales comprenden además los precursores de las proteínas hidantoinasa y/o deshidropirimidinasas maduras, así como sales de las mismas. Las sales comprenden sales de grupos carboxilo y sales de adición de ácido de grupos amino. Las sales de grupos carboxilo se pueden producir de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica y comprenden sales inorgánicas, tales como sales de sodio, calcio, amoníaco, hierro y cinc, así como sales formadas con bases orgánicas tales como aminas, por ejemplo, trietanolamina, arginina, lisina, y piperidina. Las sales de adición de ácido comprenden sales con ácidos minerales, tales como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales formadas con ácidos orgánicos, tales como ácido acético y ácido oxálico.

También se pueden obtener equivalentes funcionales modificando hidantoinasas y/o dihidropirimidinasas de origen natural en una o más cadenas secundarias de los aminoácidos, o en los extremos N o C. Dichos derivados pueden comprender, por ejemplo, ésteres alifáticos de grupos carboxilo, amidas de grupos carboxilo, que se pueden obtener mediante reacción con amoníaco o una amina primaria o secundaria, N-acil derivados o grupos amino libres, que se pueden obtener mediante reacción con grupos acilo, u O-acil derivados de grupos hidroxilo libres, que se pueden obtener mediante reacción con grupos acilo. También se incluyen equivalentes funcionales mediante un patrón de glicosilación diferente del patrón natural (por ejemplo, después de la glicosilación o desglicosilación artificial).

Los equivalentes funcionales comprenden además enzimas obtenidas a partir de otros organismos o microorganismos, así como variantes de origen natural de la enzima de referencia.

Los equivalentes funcionales comprenden además dominios o secuencias únicos que tienen la actividad deseada de hidantoinasas y/o dihidropirimidinasas.

Además, los equivalentes funcionales pueden ser proteínas de fusión que comprenden secuencias de origen natural o equivalentes funcionales de las mismas combinadas con al menos una secuencia funcionalmente diferente en unión del extremo N o del extremo C, que no eliminan la actividad hidantoinasa y/o dihidropirimidinasas de la proteína. Los ejemplos no limitantes de dicha secuencia funcionalmente diferente son los péptidos de señal (por ejemplo, que dirigen la excreción de la proteína de fusión), enzimas (por ejemplo, para añadir actividades enzimáticas adicionales) o partes de inmunoglobulinas (por ejemplo, para inmovilizar la proteína de fusión).

Los equivalentes funcionales también comprenden homólogos de las proteínas naturales. Dichos homólogos tienen una homología de al menos el 60 %, preferentemente al menos un 75 %, y en especial al menos un 85 %, tal como un 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una secuencia de aminoácidos de origen natural (según se calcula mediante el algoritmo de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8), 1988, 2444-2448)." % de homología· de un polipéptido en particular dado denota el porcentaje de identidad de los restos de aminoácidos con respecto a la longitud total de la enzima de referencia o subunidad enzimática.

Los equivalentes funcionales también se pueden producir por procedimientos conocidos en la materia. Los procedimientos para la modificación de los genes y, por consiguiente, de las proteínas codificadas por dichos genes, se conocen desde hace mucho tiempo, tales como mutagénesis dirigida al emplazamiento, donde uno o varios nucleótidos de un gen se intercambian de una forma específica (MK Trower (Hrsg.) 1996; In vitro mutagenesis protocols. Humana Press, Nueva Jersey), mutagénesis con saturación, que permite el intercambio o la adición de un codón para cualquier aminoácido en cualquier posición de un gen (Kegler-Ebo DM, Docktor CM, DiMaio D (1994) NucleicAcids Res 22:1593; Baretino D, Feigenbutz M, Valcarel R, Stunnenberg FIG (1994) NucleicAcids Res 22:541; BarikS (1995) Mol Biotechnol 3:1), reacción en cadena de la polimerasa propensa a errores (PCR propensa a errores), en la que las secuencias de nucleótidos se mutan por las ADN polimerasas, que no trabajan sin errores (Eckert KA, Kunkel TA (1990) NucleicAcids Res 18:3739); el paso de los genes a cepas mutadoras, en las que se observa un aumento en la tasa de mutación, por ejemplo, debido a defectos en los mecanismos de reparación del ADN (Greener A, Callahan M, Jerpseth B (1996) An efficient random mutagenesis technique using an E.coli mutator strain. En: Trower MK (Hrsg.) In vitro mutagenesis protocols. Humana Press, Nueva Jersey), o intercambio de ADN, en el que, en primer lugar, una combinación de genes estrechamente relacionados se digiere y, posteriormente, los fragmentos obtenidos se utilizan como moldes en una reacción en cadena de la polimerasa, en la que se crean genes mosaico de longitud completa mediante la separación y fusión repetida de hebras (StemmerWPC (1994) Nature 370:389; StemmerWPC (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:10747).

Dependiendo del procedimiento aplicado, los expertos en la materia pueden introducir mutaciones meramente aleatorias o más dirigidas en genes o regiones no codificantes (que pueden ser relevantes para la regulación de la expresión) y posteriormente crear bancos de genes. Los procedimientos necesarios son conocidos por los expertos en la materia, y se describen, por ejemplo, en Sambrook und Russell, Molecular Cloning. 3. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.

Cuando los procedimientos de lo que se denomina "evolución directa" (como se describe, entre otros, en Reetz MT und Jaeger K-E (1999), Topics Curr Chem 200:31; Zhao H, Moore JC, Volkov AA, Arnold FH (1999), Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution, En: Demain AL, Davies JE (Hrsg.) Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology) se aplican, los equivalentes funcionales se pueden crear según un enfoque dirigido (opuesto al meramente aleatorio) y a gran escala. En una primera etapa, se crean bancos de genes de las correspondientes proteínas (tales como hidantoinasas y/o dihidropirimidinasas), por ejemplo, aplicando los procedimientos anteriormente mencionados. Los bancos de genes se expresan de una forma adecuada, por ejemplo,

mediante sistemas de expresión en bacterias o fagos. Además, los procedimientos para controlar la localización de una proteína en un hospedador mediante la selección de vectores de expresión adecuados son conocidos en la materia. Las proteínas se pueden localizar intracelularmente en el citoplasma, en membranas tras la adición de un anclaje de membrana, o extracelularmente por adición de un péptido señal que contiene una secuencia de reconocimiento para una peptidasa de señal. En una segunda etapa posterior, los clones, que expresan proteínas con características deseadas, se seleccionan o se criban. Si se utiliza un procedimiento de selección, los clones que expresan proteínas con las características deseadas sobrevivirán, ya que dichas proteínas facilitarán o garantizarán la supervivencia de las células hospedadoras (por ejemplo, enzimas, que permiten el uso de sustratos particulares o el crecimiento a temperaturas determinadas). Si se utiliza un procedimiento de cribado, todos los clones sobrevivirán. Los clones que expresan una proteína con una característica deseada se identifican mediante ensayos apropiados, que puede desarrollar el experto en la técnica. Cuando se investigan, por ejemplo, proteínas con características de unión especiales, se pueden cribar las células hospedadoras que se unen a una superficie revestida con un sustrato para determinar la capacidad de unión deseada. Las células hospedadoras que expresan dicha proteína se pueden unir al sustrato mediante la proteína expresada, mientras que las células hospedadoras que expresan proteínas no funcionales no pueden hacerlo. Cuando se realiza un cribado para determinar equivalentes funcionales que tengan características catalíticas especiales, las células hospedadoras se pueden cultivar en medio que contiene sustrato o en placas de agar que contienen sustrato. La presencia de equivalentes funcionales, por ejemplo, se puede indicar mediante cambios de color después de la modificación del sustrato mediante dichos equivalentes funcionales (si es necesario, tras la lisis de las células hospedadoras con el fin de permitir el contacto entre los equivalentes funcionales y el medio que contiene sustrato). Los equivalentes funcionales de hidantoinasas o dihidropirimidinasas se pueden cribar en medios que contienen dihidouracilos con sustituciones de interés.

En este contexto, se pueden usar sistemas automatizados (por ejemplo, robots de pipeteado para placas de microtitulación, sistemas de procesamiento de imágenes para identificar colonias en placas de agar) para permitir un cribado de alto rendimiento. Los genes correspondientes de las células hospedadoras que expresan equivalentes funcionales que tienen características que, de una forma amplia o, al menos, parcial, se corresponden con las características deseadas, se someten a una o más rondas de mutación. Las etapas para mutar y seleccionar o cribar se pueden repetir en un procedimiento interactivo hasta que los equivalentes funcionales tengan la característica deseada en un grado satisfactorio.

Aplicando un enfoque iterativo, es posible cribar proteínas con las características deseadas en un enfoque dirigido, aunque insertando numerosas mutaciones en una secuencia de proteínas, es más probable que se produzca una pérdida de funcionalidad que una mejora en una característica dada (tal como la velocidad de reacción de una enzima) o la obtención de una nueva característica (tal como aceptar una nueva clase de sustrato). Cuando se implementa el enfoque iterativo, se crea una biblioteca de genes con mutaciones basándose en la secuencia de nucleótidos de una proteína de referencia, tal como una proteína natural (por ejemplo, una hidantoinasa o dihidropirimidinasas particular). En este contexto, la tasa de mutación seleccionada para los nucleótidos producirá un número relativamente bajo de aminoácidos a mutar en los correspondientes péptidos o proteínas traducidos, por ejemplo, de 1 a 3 aminoácidos. Los péptidos o proteínas resultantes se criban posteriormente para determinar la característica deseada (por ejemplo, una mayor actividad catalítica para uno o más sustratos, una gama de sustratos expandida o alterada, un aumento en la estabilidad a valores de temperatura o pH más altos o alterados, o en presencia de disolventes particulares). Basándose en las secuencias de proteínas o péptidos con dichas características deseadas (que pueden ser evidentes solamente en un grado bajo), se crea una segunda biblioteca de genes, y de nuevo se introduce una baja tasa de mutaciones. Posteriormente, las proteínas traducidas se criban según la característica deseada. El ciclo de crear una biblioteca de genes mutada y el cribado de péptidos o proteínas expresadas sobre la base de la biblioteca puede repetirse tantas veces como se considere necesario. La selección de una baja tasa de mutación por ciclo evitará la situación en la que prácticamente todas las proteínas sean no funcionales debido a la acumulación de demasiadas mutaciones. La baja tasa de mutación (y, en paralelo), la manifestación escasa o lenta de las características deseadas se puede compensar repitiendo iterativamente la mutación (lo que conduce posiblemente a equivalentes funcionales) y la selección (de los equivalentes funcionales deseables), llevando de esta forma a una acumulación de mutaciones útiles, y proporcionando finalmente una tasa elevada de proteínas satisfactorias, con características deseadas mejoradas. Mediante el análisis de secuencia de los equivalentes funcionales con características mejoradas, se puede obtener información de secuencia que identifican posiciones o zonas de la secuencia dentro de un péptido o proteína, que son importantes para una característica deseada. Los ejemplos para la creación de proteínas con características deseadas, para las que los procedimientos adicionales para introducir mutaciones serán evidentes, se describen en Zhao und Arnold, *Protein Engineering* 12:47-53 (1999) o en May y col., *Nature Biotechnology* 18:317-320 (2000).

También se pueden obtener equivalentes funcionales obtenidos mediante secuencias de ácido nucleico derivado de las secuencias de ácidos nucleicos que subyacen las proteínas anteriormente descritas. Salvo que se especifique adicionalmente, una secuencia de ácido nucleico derivada de un ácido nucleico original denota una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad, comparada con el ácido nucleico original, de al menos un 80 % o al menos un 90 %, en particular aproximadamente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. 100 % de identidad denota la identidad de nucleótidos de dos secuencias del ácido nucleico respecto a la longitud del ácido nucleico completo, en particular una identidad determinada por comparación de ambas secuencias de ácidos nucleicos usando el programa informático Vector NTI Suite 7.1 de Infomax (USA) y el procedimiento Clustal.

Los ácidos nucleicos derivados (secuencias de ADN o ARN monocatenario o bicatenario, tales como ADNc o ARNm) se pueden sintetizar químicamente a partir de bloques de construcción de nucleótidos por procedimientos conocidos en la materia, por ejemplo, mediante condensación de bloques de construcción de nucleótidos u oligómeros. Por ejemplo, la síntesis química se puede llevar a cabo mediante el procedimiento de la fosforamidita (Voet, Voet, 2. Ed., Wiley Press, Nueva York, p. 896-897). La fusión de oligonucleótidos sintéticos y el llenado de los huecos usando el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa, reacciones de ligadura, así como los procedimientos de clonación en general son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Los derivados de ácidos nucleicos se pueden identificar en bases de datos o aislarse a partir de bancos de genes u organismos. En especial, los derivados de ácidos nucleicos se pueden aislar usando los ácidos nucleicos correspondientes a las secuencias peptídicas de acuerdo con la SEQ ID NO:1-5 o 7 como sondas para hibridación o como cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las sondas o cebadores suelen comprender una región de secuencia de nucleótidos que, en condiciones rigurosas, se hibrida con al menos 12, preferentemente al menos 25, tal como aproximadamente 40, aproximadamente 40 o aproximadamente 75 nucleótidos consecutivos de la hebra de sentido directo o la hebra de sentido contrario de una secuencia potencial derivada de ácidos nucleicos. La secuencia potencial derivada de ácidos nucleicos puede estar presente en bancos génicos, en material celular de un organismo diana, por ejemplo, las células (preferentemente células permeabilizadas) o componentes celulares extraídos de los mismos (preferentemente ácidos nucleicos al menos parcialmente purificados), en el que el organismo diana es un organismo a examinar para determinar la presencia de los ácidos nucleicos derivados. El material celular se puede separar en geles de agarosa y mediante transferencia a las membranas para realizar una hibridación mediante transferencia Northern o transferencia Western en condiciones normalizadas para detectar la presencia de fragmentos de ácido nucleico que se unan a las sondas empleadas o, como alternativa, puede servir como molde para cebadores en reacciones de la PCR, en las que las sondas o los cebadores se pueden derivar de las secuencias de ácidos nucleicos subyacentes a cualquiera de las secuencias peptídicas de acuerdo con la SEQ ID NO:1-5 o 7. Las bandas de ácido nucleico hibridante sobre las membranas o geles de la transferencia, o los ácidos nucleicos del molde hibridante en reacciones de la PCR (que se pueden amplificar usando cebadores directos o inversos derivados del ácido nucleico original, o cebadores aleatorios) se pueden aislar y clonar en vectores adecuados de acuerdo con los procedimientos generalmente conocidos en la materia (por ejemplo, Sambrook y col., 1989), y posteriormente obtener la secuencia o usarse como sondas de hibridación en condiciones incluso más rigurosas para aislar los fragmentos de ácido nucleico que contienen genes más largos o, preferentemente de longitud completa, procedentes de bancos de genes o material celular.

Las condiciones normalizadas para hibridación varían dependiendo del correspondiente ácido nucleico y por lo general comprenden temperaturas a partir de 42 °C a 58 °C en una solución de tampón acuoso de 0,1 x SSC a 5 x SSC (en la que 1 x SSC corresponde a NaCl 0,15 M, citrato de sodio 14 mM, pH 7,2), o adicionalmente en presencia de formamida al 50 %, tal como 42 °C en 5x SSC que contiene formamida al 50 %. Las condiciones de hibridación de los híbridos ADN:ADN comprenden preferentemente 0,1 x SSC y temperaturas de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, en particular de 30 °C a 45 °C. Las condiciones de hibridación de los híbridos ADN:ARN comprenden preferentemente 0,1 x SSC y temperaturas de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 55 °C, en particular de 45 °C a 55 °C. Las temperaturas anteriormente mencionadas son temperaturas ilustrativas para la hibridación de un ácido nucleico que contiene aproximadamente 100 nucleótidos y un contenido en G+C del 50 % en un tampón SSC sin formamida. Las condiciones experimentales para las hibridaciones de ADN y otras técnicas de biología molecular se describen en libros de texto o manuales de laboratorio de biología molecular (por ejemplo, Sambrook y col., 1989, Ausubel y col. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hames y Higgins (eds.), *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press, Oxford, 1985; Brown (ed.), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press, Oxford, 1991)), y los expertos en la materia pueden calcularlas de acuerdo con las fórmulas generalmente conocidas en la materia, teniendo en cuenta parámetros tales como la longitud de ácido nucleico, el tipo de híbridos y el contenido de G+C. Los ejemplos de condiciones rigurosas, por ejemplo, en transferencias Northern, comprenden el uso de 0,1 x SSC que contiene un 0,1 % de SDS (20 x SSC: NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 mM, pH 7,0) y temperaturas de 50 °C a 70 °C, preferentemente de 60 °C a 65 °C para la elución de sondas, u oligonucleótidos, unidos de forma no específica. La elección y adaptación de condiciones rigurosas es conocida en la técnica, y se describe en la bibliografía (por ejemplo, Sambrook y col., 1989).

Los ácidos nucleicos derivados se pueden aislar de acuerdo con los procedimientos conocidos en la materia. Los ácidos nucleicos aislados deben entenderse como moléculas de ácido nucleico esencialmente separadas de otras moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de desviación. Las moléculas de ácido nucleico aisladas preferentemente están desprovistas de material celular no de ácido nucleico o de medio de cultivo, o están prácticamente desprovistas de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se producen mediante síntesis química.

Los ácidos nucleicos derivados se pueden introducir en las construcciones de expresión, opcionalmente, tras su escisión mediante enzimas de restricción o ligaduras con moléculas conectoras. En las construcciones de expresión, los ácidos nucleicos derivados están unidos operativamente con elementos de regulación que controlan la expresión del correspondiente polipéptido o secuencia de proteínas derivados de la secuencia de ácido nucleico, siendo dicha secuencia de ácido nucleico una secuencia codificante de una hidantoinasa o deshidropirimidinasa útiles. Las

construcciones de expresión comprenden preferentemente un promotor en dirección 5' del ácido nucleico derivado, y una secuencia de terminación en dirección 3' del mismo, así como elementos de regulación adicionales opcionales. Se entiende que la unión operativa es la disposición secuencial de promotor, secuencia de codificación, terminador y, opcionalmente, otros elementos reguladores, de una forma que permita el correcto funcionamiento de cada uno de los elementos reguladores anteriormente mencionados con respecto a la expresión de la secuencia de codificación. Los ejemplos de elementos a unir operativamente comprenden secuencias de direccionamiento, potenciadores, y señales de poliadenilación. Otros elementos útiles comprenden marcadores seleccionables, señales de amplificación, orígenes de replicación, y similares. Los elementos de regulación útiles son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Además, o en lugar, de elementos de regulación o secuencias artificiales, puede estar presente la secuencia reguladora natural del gen estructural de una hidantoinasa o dihidropirimidinasa. La regulación natural puede inactivarse o modificarse para conseguir una expresión mayor o menor mediante modificación genética. Del mismo modo, la construcción génica puede tener también una construcción más simplificada conservando simplemente los elementos de regulación naturales sin insertar los artificiales. Los elementos reguladores naturales pueden estar mutados de tal forma que no se produce ninguna regulación, y la expresión génica es menor o -preferentemente- está aumentada. Los genes estructurales de las hidantoinasas o dihidropirimidinasa pueden estar presentes como copia única o como múltiples copias, opcionalmente copias mixtas, es decir, hidantoinasas e dihidropirimidinasa simultáneamente presentes, en una construcción génica.

Los ejemplos de promotores útiles son promotores *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacIq-*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *SP6-*, *lambda-PR-* o *lambda-PL-*, que se utilizan preferentemente en bacterias gram negativas; así como el promotor *amy* y *SP02*, o los promotores de levadura *ADC1*, *MFalpha*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*. Se pueden usar opcionalmente promotores inducibles, tales como promotores inducibles por temperatura o compuestos químicos (por ejemplo, el promotor de metalotioneína), que permiten la inducción de la expresión de hidantoinasa o dihidropirimidinasa tras la proliferación celular y la acumulación de densidades celulares adecuadas. Del mismo modo, se pueden usar promotores artificiales.

La construcción de expresión recombinante se inserta preferentemente en un vector adecuado, por ejemplo, un plásmido, que a su vez se introduce en una célula hospedadora adecuada. Los vectores son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Powels y col. (eds.), *Cloning Vectors*, Elsevier, Ámsterdam-Nueva York-Oxford, 1985). Además de los plásmidos, los vectores pueden ser todos los vectores adicionales conocidos en la materia, tales como fagos, virus, por ejemplo, *SV40*, *CMV*, *baculovirus* y *adenovirus*, transposones, elementos *IS*, fásmidos, cósmidos, y ADN lineal o circular. Los vectores se pueden replicar en un hospedador de forma autónoma, o se pueden replicar de forma cromosómica tras su integración en el cromosoma. Los ejemplos de vectores de expresión sin fusión a proteínas son *pTrc* (Amann y col., (1988) *Gene* 69:301-315) y *pET 11d* (Studier y col. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89). Los ejemplos de vectores de expresión en levaduras, por ejemplo, para su expresión en *Saccharomyces cerevisiae* son *pYepSed* (Baldari y col., (1987) *Embo J.* 6:229-234), *pMFa* (Kurjan und Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), *pJRY88* (Schultz y col. (1987) *Gene* 54:113-123) y *pYES2* (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los vectores y procedimientos para la construcción de vectores útiles en hongos, en particular hongos filamentosos, se describen en van den Hondel, C.A.M.J.J. y Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, en: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy y col., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge. Los ejemplos de vectores de baculovirus para la expresión de proteínas en células de insecto, tales como células *Sf9*, comprenden la serie *pAc* (Smith y col., (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y la serie *pVL s* (Lucklow und Summers (1989) *Virology* 170:31-39), los ejemplos de vectores de células de mamífero comprenden *pCDM8* (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) y *pMT2PC* (Kaufman y col. (1987) *EMBO J.* 6:187-195). Otros sistemas de expresión para células procariontas y eucariotas se describen en los capítulos 16 y 17 de Sambrook, Fritsch, y Maniatis, *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Usando los vectores anteriormente mencionados, se pueden producir organismos con vectores recombinantes que se han transformado con al menos uno de dichos vectores y expresan una hidantoinasa o dihidropirimidinasa útil para los procedimientos de acuerdo con la invención. Las construcciones recombinantes se pueden expresar tras la introducción en un sistema hospedador adecuado. Para la introducción se pueden usar procedimientos conocidos en la materia, tales como precipitación simultánea, fusión de protoplastos, electroporación, transformación química, y transformación retroviral. Los procedimientos adecuados se describen, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel y col., ed., Wiley Interscience, Nueva York 1997 Oder Sambrook y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Los organismos hospedadores o las células hospedadoras adecuados son aquellos que permiten la expresión de los ácidos nucleicos que codifican las hidantoinasas o dihidropirimidinasa, o los ácidos nucleicos derivados de los mismos. Las células hospedadoras comprenden bacterias, hongos, levaduras, células vegetales o animales. Los ejemplos de bacterias son las de los géneros *Escherichia*, wie z. B. *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas* oder *Burkholderia*, los ejemplos de microorganismos eucariotas son *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, células eucariotas superiores procedentes de animales o plantas, por ejemplo, células *Sf9*, *CHO* o *HEK293*, en los que las células simples o las células agregadas de formas de vida eucariotas superiores tales como animales o plantas también se pueden denominar microorganismos en el presente documento.



La selección de células correctamente transformadas se puede basar en genes marcadores contenidos en el correspondiente vector o casete de expresión. Los ejemplos de genes marcadores comprenden genes de resistencia a antibióticos o para enzimas que catalizan una reacción de formación de color, que ocasiona la tinción o la fluorescencia de la célula transformada. Dichas células se pueden seleccionar mediante clasificación celular automática. Las células correctamente transformadas que contienen un gen de resistencia a antibióticos, por ejemplo, para G418 o higromicina, se pueden seleccionar en un medio o placas de agar que contienen antibióticos. Las proteínas marcadoras expresadas sobre la superficie celular se pueden usar para la selección mediante cromatografía de afinidad.

Las células se cultivan como se describe en el Capítulo C anterior, y pueden excretar la hidantoinasa o dihidropirimidinasa al medio (permitiendo de esta forma el crecimiento o supervivencia de las células y simultáneamente, la producción biocatalítica de un precursor de  $\beta$ -aminoácidos a partir del al menos un sustrato de la fórmula general (1). En el caso de que la hidantoinasa o dihidropirimidinasa no se secrete al medio, las células se pueden permeabilizar después de crecimiento y/o la inducción de la expresión de la hidantoinasa o dihidropirimidinasa para iniciar la producción biocatalítica de un precursor de un  $\beta$ -aminoácido. Como alternativa, las células se pueden recoger después del crecimiento y la inducción de la expresión de la hidantoinasa o dihidropirimidinasa para una purificación parcial o completa de la hidantoinasa o dihidropirimidinasa, después de lo cual, la hidantoinasa o dihidropirimidinasa purificadas se pueden usar para la producción biocatalítica de un precursor de un  $\beta$ -aminoácido.

#### **E. Etapas de procedimiento adicionales**

Durante el procedimiento para obtener un precursor de un  $\beta$ -aminoácido o un  $\beta$ -aminoácido, pueden estar opcionalmente presentes una o más enzimas adicionales durante la reacción. Estas enzimas catalizan la conversión entre los enantiómeros D y L de los sustratos de dihidouracilo de acuerdo con la fórmula general (I). Los ejemplos de enzimas adecuadas comprenden dihidouracilo deshidrogenasa (por ejemplo, procedentes de fuentes de mamífero), dihidouracilo oxidasa (*Rhodotorula glutinis*) y enolato reductasa (antigua enzima amarilla).

El precursor de  $\beta$ -aminoácido de acuerdo con la fórmula general (II) (derivado de carbamoilo de un  $\beta$ -aminoácido), que se produce según el procedimiento de la presente invención, se puede escindir en el correspondiente  $\beta$ -aminoácido y el resto N-carbamoilo mientras permanece en la mezcla de reacción. Como alternativa, el precursor de  $\beta$ -aminoácido se puede separar de la mezcla de reacción que contiene el sustrato de la fórmula general (I) y la al menos una hidantoinasa y/o dihidropirimidinasa, y se puede escindir para producir el  $\beta$ -aminoácido. La escisión se puede llevar a cabo de forma química o enzimática. La escisión química se puede conseguir añadiendo una cantidad equimolar de  $\text{NaNO}_2$  al precursor de  $\beta$ -aminoácido de acuerdo con la fórmula general (II) a un pH ácido, por ejemplo, 1,0 (por ejemplo, como se describe en Fan y Lee, *Biochemical Engineering Journal* 8:157-164,2001). El pH ácido se puede lograr mediante, por ejemplo, ácido sulfúrico. La reacción de escisión se puede llevar a cabo a temperaturas bajas, por ejemplo, sobre hielo. Si la escisión del precursor de un  $\beta$ -aminoácido de la fórmula general (II) se va a conseguir de forma química, es preferible realizar esta reacción por separado de la reacción enzimática que parte del sustrato de acuerdo con la fórmula general (I) para dar el precursor de  $\beta$ -aminoácido. La escisión se puede realizar una vez que se ha completado la escisión enzimática, o que esta ha llegado al equilibrio (separación temporal), o en un recipiente de reacción diferente, después de eliminar el medio de reacción que contiene el precursor de  $\beta$ -aminoácido (separación espacial). Como alternativa a este procedimiento discontinuo, se puede conseguir un procedimiento de producción continuo poniendo en contacto el medio de reacción que contiene la molécula de sustrato de acuerdo con la fórmula general (I) con enzimas inmovilizadas (hidantoinasa y/o dihidropirimidinasa), que de esta forma quedan retenidas en el recipiente de reacción, mientras que el medio de reacción con el sustrato agotado se puede separar para la escisión del precursor de  $\beta$ -aminoácido y sustituirse simultáneamente por un medio de reacción nuevo. La escisión enzimática se puede llevar a cabo con enzimas tales como carbamoilasas (por ejemplo, E.C.3.5.1.77 o E.C.3.5.1.87) o  $\beta$ -ureidopropionasas (por ejemplo, E.C.3.5.1.6). Dichas enzimas se pueden obtener de proveedores comerciales (por ejemplo, carbamoilasa de Julich Chiral Solutions, Julich, Alemania).

#### **F. Valores de pH y sistemas tampón**

El procedimiento de acuerdo con la invención para convertir un sustrato de acuerdo con la fórmula general (1) en un precursor de  $\beta$ -aminoácido de acuerdo con la fórmula general (2) se lleva a cabo preferentemente a un Ph de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 11,0, preferentemente a un pH de aproximadamente 7,5 a 10,0. En especial, el pH está en el intervalo de 7,5 a 8,5, más especialmente en el intervalo de aproximadamente 7,5 a 8,0. Los valores de pH especialmente preferidos son aproximadamente 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 y 8,0.

Se puede usar cualquier tampón adecuado para los valores de pH o intervalos de pH anteriormente mencionados, por ejemplo, un tampón fosfato, tampón borato y tampones Tris. En un intervalo de pH de 7,5 a 9,0, se prefieren los tampones Tris, mientras que los tampones fosfato son útiles en un intervalo de pH de 6,0 a 8,0. Son especialmente preferidas las soluciones de reacción tamponadas con Tris. La concentración del tampón se puede determinar dependiendo de la concentración del sustrato utilizado, y preferentemente está en el intervalo de 1 mM a 200 mM, por ejemplo, de 1 mM a 100 mM, de 1 mM a 50 mM. En especial, la concentración de tampón puede ser de 2 mM a 25 mM o de 3 mM a 10 mM, tal como 5 mM.

#### **G. Temperatura y duración de la reacción**

El procedimiento de la bioconversión catalítica de un sustrato de la fórmula general (I) se puede llevar a cabo a cualquier temperatura que sea tolerable para la hidantoinasa y/o dihidropirimidinasa usadas. Las temperaturas normalmente se correlacionan con las temperaturas de crecimiento óptimas de los organismos o microorganismos que contienen la una o más enzimas o que se utilizan como fuente para su extracción, pero se pueden determinar fácilmente por una persona experta en la materia. En general, el procedimiento se puede llevar a cabo a temperaturas de 30 °C a 60 °C, en particular de 40° a 50 °C. Los ejemplos de temperaturas de reacción son de aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C y aproximadamente 60 °C.

El procedimiento puede proceder hasta que se logra el equilibrio entre el sustrato de la fórmula general (I) y el precursor de un  $\beta$ -aminoácido de la fórmula general (2), pero se puede detener antes. Los tiempos de procedimiento habituales están en el intervalo de 1 minuto a 25 horas, en particular de 10 min a 6 horas. Los tiempos de reacción preferidos están en el intervalo de 1 hora a 4 horas, en particular de 1,5 horas a 3,5 horas.

#### **H. Componentes adicionales en el medio de reacción**

Para aumentar la solubilidad de los sustratos con R<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup> prácticamente hidrófobos, se pueden incluir uno o más codisolventes orgánicos en el medio de reacción.

Como alternativa, la reacción se puede llevar a cabo en sistemas bifásicos que comprenden fases acuosas y no acuosas. Los ejemplos de disolventes adecuados para la fase no acuosa son hidrocarburos alifáticos, que comprenden preferentemente de 5 a 8 átomos de carbono, tales como pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, heptano, octano o ciclooctano, hidrocarburos alifáticos halogenados, que comprenden preferentemente uno o dos átomos de carbono, tales como diclorometano, cloroformo, tetraclorometano, dicloroetano, hidrocarburos aromáticos, tales como benceno, tolueno, xilenos, clorobenceno o diclorobenceno, éteres alifáticos acíclicos o cíclicos, que comprenden preferentemente de 4 a 8 átomos de carbono, tales como éter de dietilo, metil terc-butil éter, etil terc-butil éter, dipropil éter, diisopropil éter, tetrahidrofurano, o ésteres, tales como acetato de etilo o acetato de n-butilo, o cetonas, tales como metil isobutil cetona, o dioxano, o mezclas de los mismos.

En realizaciones particulares, el medio de reacción es un medio de reacción acuoso que contiene codisolventes orgánicos, especialmente como sistema monofásico. Los ejemplos de codisolventes adecuados son butan-2-ol, metil terc-butil éter (MTBE) y dimetilsulfóxido (DMSO). Si se va a usar MTBE, se prefiere una concentración por debajo de la saturación en medio acuoso (aproximadamente un 12 % en volumen, por ejemplo, aproximadamente 6 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 1 % o menos del 1 %. El MTBE se puede usar hasta la concentración de saturación en medio acuoso (aproximadamente el 6 % en volumen), mientras que el DMSO se puede usar hasta concentraciones de aproximadamente un 2 % en volumen para aumentar la solubilidad del sustrato sin interferir prácticamente con el rendimiento del procedimiento.

#### **I. Recuperación de los N-carbamoil $\beta$ -aminoácidos o $\beta$ -aminoácidos**

Los procedimientos para aislar los aminoácidos y los N-carbamoil aminoácidos del medio de reacción son conocidos en la técnica y comprenden técnicas tales como filtración en gel, HPLC, cromatografía en fase invertida y cromatografía de intercambio iónico. La cromatografía de intercambio iónico, especialmente la cromatografía de intercambio aniónico es un procedimiento preferido. Las matrices de intercambio iónico adecuadas comprenden intercambiadores de aniones fuertes (por ejemplo, Q Sepharose, basada en amonio cuaternario) e intercambiadores de aniones débiles (por ejemplo, DEAE Sepharose, basada en diaminoetilo). Los ejemplos de procedimientos preferidos son la cromatografía de intercambio aniónico usando columnas DEAE, o extracción con un disolvente orgánico, usando acetato de etilo para extraer sustrato, seguido de 2-butanol para extraer el producto de biotransformación.

La invención se mostrará ahora en detalle mediante los siguientes ejemplos que ilustran la invención, pero que no se pretende que limiten la invención.

#### **Ejemplos**

##### **Experimentos químicos**

Se llevó a cabo la TLC usando placas de soporte plástico revestidas con gel de sílice 60F254 de 0,2 mm de espesor (Mackerey-Nagel). Las placas se visualizan mediante luz UV (254 nm) o inmersión en permanganato. Los productos químicos se compraron a Sigma-Aldrich, Acros o Fluka salvo que se indique otra cosa. Todos los reactivos eran de calidad de laboratorio convencional y los disolventes anhidros, y se usaron tal como se suministraron salvo que se indique otra cosa. Las RMN 1H y 13C se registraron en un espectrómetro Bruker AC300 o AC400. Se usaron las siguientes abreviaturas:  $\delta$ , desplazamiento químico; s a, singlete amplio; d, doblete; dd, doblete de dobletes; J, constante de acoplamiento; m, multiplete; c, cuadruplete; qui, quintete; s, singlete; sep, septete. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se notifican en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. El disolvente prático residual, DMSO-d6 ( $\delta$  H 2.50, qui) se usó como patrón interno en los espectros de RMN 1 H, y los desplazamientos en 13C RMN se referenciaron usando DMSO-d6 ( $\delta$  C 39,5, sep) con desacoplamiento de banda ancha.

**Experimentos de biotransformación**

5 Salvo que se indique otra cosa, todos los experimentos se llevaron a cabo a una escala de 5 mM en 6-PDHU (4,75 mg) en 5 ml de tampón TRIS (0,1 M pH 7,5) con 1 U de hidantoinasa procedente de *Vigna angularis* comercialmente disponible (35 mg, obtenida de Sigma, St. Louis, EE.UU. en tubos Falcon de 15 ml, se incubaron en un termomezclador (Falcon) a 750 rpm y a una temperatura de 50 °C.

Las biotransformaciones se llevaron a cabo usando '1 Unidad/reacción', en la que 1 Unidad se define como la cantidad que cataliza la formación de 1 µmol de N-carbamoil-glicina por minuto, a partir de hidantoína.

**Ejemplo 1: Ensayos de hidrólisis de hidantoína 5-sustituída o de 6-fenildihidouracilo**

10 Para determinar la actividad hidantoinasa, se añadió D-hidantoinasa (10,5 mg) a 5-fenilhidantoína (1,32mg) disueltas en tampón borato (1,5 ml, 0,1 M, pH 9,0). La biotransformación se incubó en un Eppendorf "Thermomixer comfort", (40 °C, 1400 rpm). En puntos temporales dados, se tomaron alícuotas (100 µl) de la mezcla, y la reacción se detuvo mediante desnaturalización de la enzima y precipitación de la proteína soluble mediante adición de TCA, (12 % p/v, 175 µl). Tras la centrifugación, el sobrenadante se recogió y se analizó mediante HPLC, en el que se usaron los siguientes parámetros:

15 Columna: Agilent Zorbax XBD-C18 4,6 mm x 50 mm, 3,5 µm.  
Condiciones: 25 °C, 1 ml/min de H<sub>2</sub>O:acetonitrilo, 85:15 (+0,1 % de TFA)

Los tiempos de retención de la 5-fenilhidantoína (3,6), N-carbamoil-α-fenilglicina (2,7). La configuración del ensayo se puede usar para determinar la actividad hidantoinasa de una enzima que se sospecha de tener dicha actividad sustituyendo D-hidantoinasa por dicha enzima.

20 Para determinar la actividad dihidropirimidinasa, se añadió D-hidantoinasa (10,5 mg) a 6-fenildihidouracilo, (1,14 mg,) disuelta en tampón Tris (300 µl, 0,1 M, pH 7,5). La biotransformación se incubó en un Eppendorf "Thermomixer comfort", (40 °C, 1400 rpm). En puntos temporales dados, se tomaron alícuotas (100 µl) de la mezcla, y la reacción se detuvo mediante desnaturalización de la enzima (95 °C, 5 min), y la precipitación de proteína soluble mediante adición de metanol (300 µl). Tras la centrifugación, el sobrenadante se recogió y se analizó mediante HPLC, en donde se usaron los siguientes parámetros: c-18 rpHPLC: fase móvil isocrática, 25 °C, H<sub>2</sub>O: ACN, 90:10 + 0.1 % de TFA  
25 Tiempos de retención: 6-fenildihidouracilo (12,6), N-carbamoil-β-fenilalanina (NCBPA, 4, 9,6) TCA (4,3) DMSO (1,6), columna Astec Chirobiotic T, 25 cm x 4,6 mm, 5 µm: fase móvil isocrática, 5 °C, acetato de amonio 20 mM (pH 6,5): MeOH, 70:30

Tiempos de retención: 6PDHU (15,9, 27,5), NCBPA (7,8, 6,8)

**Ejemplo 2: Aislamiento de una hidantoinasa a partir de *Vigna angularis***

Se aisló una proteína con actividad hidantoinasa a partir de *Vigna angularis* de la siguiente forma:

**2.1. Extracción de las judías**

35 885 g de judías Adzuki (obtenidas de un almacén de alimentos sanos) se trituraron en dos alícuotas junto con hielo seco, usando una mezcladora convencional. Al polvo de judías obtenido, se añadieron 4 l de tampón de extracción (Tris 20 mM, ácido ascórbico 10 mM, lisina 10 mM, pH 7,5), la suspensión se agitó durante toda la noche a 4 °C, se filtró a través de una gasa, y se centrifugó. Se obtuvieron 2500 ml del extracto bruto, con un contenido en proteína de 9,5 mg/ml, y se almacenaron a -20 °C hasta que se realizaron las posteriores etapas cromatográficas (usando columnas de cromatografía de Amersham Pharmacia o GE Healthcare).

40 2.2. La columna AQ-Sepharose FF-cromatografía para la cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose Fast Flow) (diámetro: 5 cm; longitud: 21 cm) se lavó con Tris 200 mM/HCl (pH 7,5), equilibrado con tampón de análisis A (Tris 20 mM/HCl, ácido ascórbico 1 mM, L-lisina-HCl 1 mM, pH 7,5), y se cargaron con el extracto bruto (5 g de proteína total). Se aplicó un gradiente lineal de tampón de análisis A a tampón de análisis B (Tris 20 mM/HCl, NaCl 750 mM, ácido ascórbico 1 mM, L-lisina-HCl 1 mM, pH 7,5) y se recogieron las fracciones activas.

Usando el reactivo de Ehrlich, se determinó de la siguiente forma la actividad de las fracciones:

45 50 ml de muestra de proteína se incubaron con 50 µl de 5-hidantoína (100 mM en tampón borato 100 mM, pH 9) a temperatura ambiente durante 10-60 min (dependiendo del contenido de enzima). Las proteínas presentes en la muestra se precipitaron completamente mediante la adición de 150 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 12 % y se eliminaron mediante centrifugación. 50 µl de 4-(dimetilamino)-benzaldehído (10 % en HCl 6 M) se añadieron a 200 µl de sobrenadante y se midieron fotométricamente a 450 nm.

**2.3. Cromatografía hidrófoba (fenil sefarosa, flujo rápido)**

Se usó una columna de fenil sefarosa con un diámetro de 5 cm y una longitud de 21 cm. Las fracciones activas combinadas de la cromatografía de intercambio iónico (280 ml) se diluyeron hasta 500 ml mediante adición de agua,

se añadieron 67 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para obtener una saturación del 25 %, y la mezcla resultante se aplicó a la columna. Tampón de ensayo A (Tris 20 mM, 25 % de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , lisina 1 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7,5; también usado como tampón de lavado) se aplicó a un caudal de 15 ml/min. Tras cambiar linealmente el medio de la columna al tampón de análisis B mediante adición de dos volúmenes de columna de tampón de análisis B (Tris 20 mM, lisina 1 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7,5), se añadieron dos volúmenes de columna de tampón de análisis B para elución. Para el enjuagado posterior, se usó tampón C (Tris 10 mM/HCl, pH 7,5, 2-propanol al 10 %). Se combinaron las fracciones activas con la absorción más alta según se determina en un ensayo de hidantoinasa usando el reactivo de Ehrlich.

#### 2.4. Cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel Superdex Prep Grade 200)

10 Para la siguiente etapa de purificación, una columna Superdex 200 (diámetro: 2,6 cm, longitud: 60 cm) se hizo funcionar a un caudal de 4 ml/min. Al combinado de fracciones activas obtenidas a partir de la cromatografía hidrófoba, se añadieron 70,2 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para obtener una saturación del 80 %, y la mezcla resultante se centrifugó (20 min, 12.000 rpm) para obtener un aglomerado. El aglomerado resultante se disolvió en 10 ml de tampón de análisis isocrático (Tris 20 mM/HCl, pH 7,5) y se aplicó a la columna.

#### 15 2.5. Cromatografía de afinidad Blue HiTrap 5 ml

La columna de cromatografía de afinidad Blue HiTrap 5 ml se equilibró con tampón A (Tris 20 mM/HCl, pH 7,5). Después de cargar el combinado de fracciones activas procedente de la cromatografía de tamiz molecular según se determina en un ensayo de hidantoinasa usando el reactivo de Ehrlich [confirmar, por favor], la columna se hizo funcionar isocráticamente con 5 volúmenes de columna de tampón B (Tris 20 mM/HCl, NaCl 500 mM, pH 7,5) y posteriormente con 2 volúmenes de columna de tampón C (Tris 20 mM/HCl, pH 7,5, NaCl 500 mM, NAD 1 mM, NADP 1 mM). Esta etapa de cromatografía de afinidad se usó para eliminar la glucosa deshidrogenasa (no muestra actividad con respecto a la glucosa y el NAD/NADP) mediante unión a la columna.

#### 2.6. Cromatografía de intercambio aniónico (Mono Q HR 5/5)

25 El flujo pistón procedente de la cromatografía de afinidad anterior se cargó sobre una columna Mono Q (diámetro: 0,5 cm) a un caudal de 1 ml/min. Se aplicó un gradiente lineal de tampón de análisis A (Tris 20 mM/HCl, pH 7,5) a tampón de análisis B (Tris 20 mM/HCl, NaCl 750 mM, pH 7,5). La combinación de las fracciones se basó en sus respectivas actividades y la presencia de la banda en geles de proteína.

#### 2.7. Filtración en gel con Superose 6 calidad prep de 125 ml

30 Las fracciones activas combinadas procedentes de la cromatografía de intercambio aniónico anterior se concentraron hasta un volumen de 1 ml (utilizando un dispositivo centriprep con un corte de pesos moleculares de 10 kD) y se cargaron sobre una columna Superose a un caudal de 1 ml/min. Como tampón de análisis, se usó Tris 20 mM/HCl (pH 7,5).

Las alícuotas procedentes de las diferentes etapas de purificación, como se ha descrito anteriormente, se cargaron sobre un gel y se sometieron a electroforesis en SDS poliacrilamida (SDS PAGE). El gel resultante se tiñó con azul de Coomassie y se muestra en la Fig. 1, en la que las hileras de la izquierda a la derecha corresponden a:

- 1) Patrón de peso molecular (Precision Plus Protein Marker de BioRad, correspondiente a 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kD, respectivamente).
- 2) Extracto exento de células antes de la purificación
- 3) Fracción de intercambio aniónico Q-Sepharose FF
- 4) Fracción Fenilsefaraosa FF HIC
- 5) Fracción de filtración en gel Superdex Prep Grade 200
- 6) Fracción de cromatografía de afinidad Blue HiTrap 5 ml
- 7) Fracción de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5
- 8) Fracción de filtración en gel Superose 6 calidad prep 125 ml
- 9) Patrón de peso molecular (como en la hilera 1)
- 45 10) Preparación independiente (correspondiente a una fracción de intercambio aniónico Mono Q HR)

Se obtuvo una proteína parcialmente purificada, con un peso molecular de aproximadamente 55 kD (indicada por la flecha superior en la Fig. 1). La segunda proteína de aproximadamente 35 kD (indicada por la flecha superior en la Fig. 1) es glucosa deshidrogenasa.

50 Las fracciones combinadas de la filtración en gel Superose 6 calidad se precipitaron con cloroformo/metanol, y 500  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico (70 %) se añadieron al precipitado. Se añadieron 1-2 cristales de BrCN para llevar a cabo la escisión de bromo cian. Una solución de albúmina de suero bovino (BSA, 2 mg/ml) se usó como control de escisión. Tras incubar ambas soluciones durante 2-3 horas a temperatura ambiente, el ácido fórmico y el bromo cian se eliminaron mediante un flujo de nitrógeno. Los residuos se disolvieron en un tampón de muestra de gel de tricina que contenía mercaptoetanol al 1 % y se incubaron durante 5 min a 95 °C. Las muestras obtenidas se cargaron sobre un gel de tricina (gradiente del 10-20 %) y se dispersaron sobre una membrana de PVDF. Los fragmentos de péptido sobre la

transferencia se identificaron mediante tinción y se sometieron a secuenciación del extremo N.

Se identificaron las siguientes secuencias de péptido potenciales:

- 5 IELGITGPEGQRLAGPTVL (SEQ ID NO:1)  
 IELGITGPEGQRLAGPVL (SEQ ID NO:2)  
 IELITGPEGQRLAGPTVL (SEQ ID NO:3)  
 IELITGPEGQRLAGPVL (SEQ ID NO:4)  
 EEIARARKSGQRVIGEPVAS (SEQ ID NO:5)  
 ITGPEGQRLAGP (SEQ ID NO:7)

- 10 Las secuencias parciales obtenidas tienen una elevada homología con una secuencia de *Glycine max* con el número de registro de Genbank ACU20291 (SEQ ID NO:6), que se denomina como D-hidantoinasa, confirmando de esta manera la naturaleza hidantoinasa de la proteína aislada. La SEQ ID NO:6 se muestra a continuación, las regiones de homología están subrayadas:

mqfsitsqflhifsltifiiitsslsqssqfcdagteipsskllikggtvvnaghhqia  
 dvyvedgiivavnpnimvgddvtvidatgkyvmpggidphthldmdvgftatvddffsgqaaal  
 aggttmhidfviplngsltagfedyekkakkscomdygfhmvitkwdetvsremelmvkekgins  
 fkffmaykgilmindelllegfkckslgavamvhaengdavyegqrkmielgitgpeghalsr  
pavlegeatarairladfvntplyvvhvmsidameeiakarkagqrvigepiasglaldeswlw  
 hpdfeiaakyvmppirkrgdhkalqaalstgvlqlvgtdhcafnstgkargiddfrkmpngvn  
 gieermhlvwdimvesgqisvtdyvritstecakifniyprkgavlpgsdadiiilnpsnfem  
 sakshhsrldtnvyegrrgkgievtiaggrvvwennelkvtpgtgryiqmppfsylfdgldkk  
 daiylnslqapvkrakas

15 **Ejemplo 3: Comparación de actividad entre la hidantoinasa comercialmente disponible y la hidantoinasa aislada**

Se compararon las actividades de la hidantoinasa obtenida de Sigma y la hidantoinasa aislada del Ejemplo 2.

Para determinar y comparar la actividad específica de la enzima Sigma y la hidantoinasa (BP), 5 mM de hidantoína, 5-fenilhidantoína o 6-fenildihidouracilo, respectivamente, en Tris 50 mM HCl pH 7,5 se incubaron con diferentes cantidades de enzima durante 30 min a 40 °C.

- 20 La reacción se detuvo por adición de HCl conc. y a continuación se midió mediante HPLC.

La siguiente Tabla 1 muestra las actividades específicas de la enzima sigma y la enzima aislada en el Ejemplo 2. Ambas enzimas muestran la actividad más alta frente a 5-fenilhidantoína seguido por hidantoína.

**Tabla 1:**

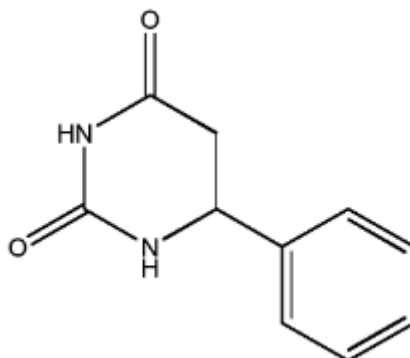
Sustrato	Enzima de sigma	Enzima del Ejemplo 2
Hidantoína	217	425
5-Fenilhidantoína	261	557
6-Fenildihidouracilo	6	72

**Ejemplo 4: Síntesis de dihidouracilos racémicos 6 sustituidos (esquema general)**

- 25 Los sustratos de dihidouracilo 6-sustituidos 4<sup>a</sup>-i se prepararon mediante una de dos rutas alternativas (Fig. 2). En el procedimiento A (Cabaleiro, M. C., Journal of Chemical Research 7:318-320,2000), se calentó urea con el derivado de ácido cinámico adecuado 7 a 190 °C durante 2-4 h, seguido por recristalización del producto, para dar 4<sup>a</sup>-i con ~45 % de rendimiento. El procedimiento B implica el tratamiento del correspondiente β-aminoácido racémico con cianato de potasio seguido por calentamiento para llevar a cabo la ciclación y obtener 4<sup>a</sup>-i con alto rendimiento. El procedimiento B, que también se sabe que transcurre sin racemización, también se usó para preparar el (S)-4<sup>a</sup> y el (S)-5<sup>a</sup> enantioméricamente puros, usando el (S)-6<sup>a</sup> enantioméricamente puro como material de partida.
- 30

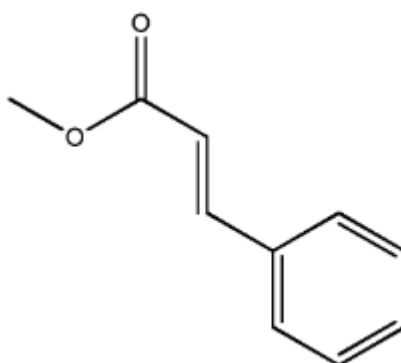
Ejemplo 5: Síntesis de dihidouracilos racémicos 6 sustituidos o moléculas precursoras (síntesis individual)

a) Síntesis de (±)-6-fenildihidouracilo de acuerdo con la siguiente fórmula



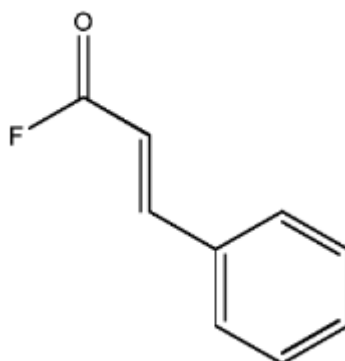
Una mezcla de ácido trans-cinámico (10,00 g, 67,5 mmol) y urea (20,25 g, 337,5 mmol) se calentó a 210 °C durante 30 minutos. Esto dio como resultado la formación de un líquido homogéneo de color amarillo. Por cada hora que la reacción transcurrió se añadió más cantidad de urea (2,03 g, 33,8 mmol). Después de agitar durante 4 horas, se añadió agua hirviendo (80 ml) y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1 hora más a 95 °C. Tras la extracción del sólido residual de la mezcla de reacción mediante filtración en caliente, el precipitado blanco que se formó se aisló mediante filtración, para dar como resultado un sólido de color blanco (6,0 g, rendimiento = 46 %).  $R_f$  0,3 (EtOAc);  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO $_d_6$ ) 2,61 (1 H, dd, J = 6,8, 16,1, CH $_2$ ), 2,83 (1H, dd, J = 5,8, 16,1, CH $_2$ ), 4,64-4,70 (1H, m, CHPh), 7,27-7,41 (5H, m, Ph), 8,01 (1 H, s a, CHNHCO), 10,18 (1H, s a, CONHCO);  $\delta_C$  (100 MHz, DEPT, DMSO $_d_6$ ) 38,6 (CH $_2$ ), 50,4 (CHPh), 126,4 (Ph), 128,0 (Ph), 129,0 (Ph), 141,5 (CPh), 154,2 (NHCONH), 170,2 (NHCOCH $_2$ );  $R_t$  9,6 y 14,8 minutos (quirobiótico T, tampón acetato de amonio pH 5,5: metanol 7:3, 1 ml/minuto).

b) Síntesis de trans-cinamato de metilo de acuerdo con la siguiente fórmula:



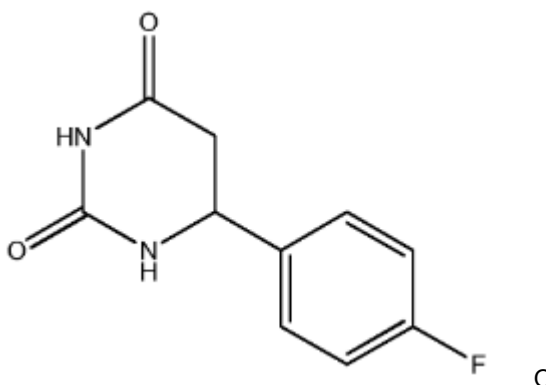
A una disolución de ácido trans-cinámico (500 mg, 3,4 mmol) en metanol (5 ml) se añadió ácido sulfúrico concentrado (100  $\mu$ l). Después de 10 minutos de irradiación de microondas (300 W, 200 °C) el disolvente se eliminó a vacío. El sólido precipitado de color blanco se disolvió en acetato de etilo (10 ml) y la capa orgánica se lavó dos veces con hidrogenocarbonato de sodio (5 ml) y salmuera (5 ml) después de eliminar el disolvente al vacío para dar como resultado el sólido cristalino de color blanco (468 mg, 86 %).  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) 3.73 (3H, s, CH $_3$ ), 6,65 (1H, d, J = 16,1, CHCHPh), 7,40-7,46 (3H, m, Ph), 7,67 (2H, d, J = 16,1, CHCHPh), 7,70-7,76 (2H, m, Ph).

c) Síntesis de fluoruro de hidrocinafolilo de acuerdo con la siguiente fórmula:



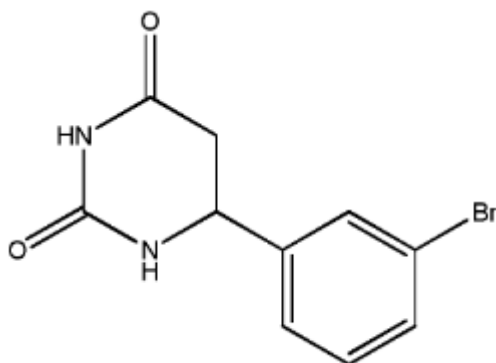
5 A una solución agitada a temperatura ambiente de ácido trans-cinámico (500 mg, 3,4 mmol) en DCM anhidro (5 ml) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se añadió trifluoruro de dimetilaminoazufre (0,31 ml, 2,4 mmol). Tras agitar durante 2 horas, se añadió agua con hielo (5 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con DCM (5 ml). La combinación de capas de DCM se lavó dos veces con agua-hielo (5 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y el disolvente se eliminó al vacío para dar como resultado un aceite de color marrón 451 mg, 88 %) que se usó en reacciones posteriores sin purificación adicional.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 6,78 (1H, dd, J = 8,0, 16,1 CHC(O)F), 7,45-7,55 (3H, m Ph), 7,81-7,86 (1H, m, Ph), 7,97 (1 H, d, J = 16,0, CHPh).  $\delta_C$  (100 MHz, DEPT, DMSO-d<sub>6</sub>) 112,6 (CHCHPh), 129,4 (Ph), 129,6 (Ph), 132,3 (Ph), 133,5 (Ph), 152,2 (CHPh), 159,1 (C(O)F).

10 d) Síntesis de (±)-3-fluoro-6-fenildihidouracilo de acuerdo con la siguiente fórmula:



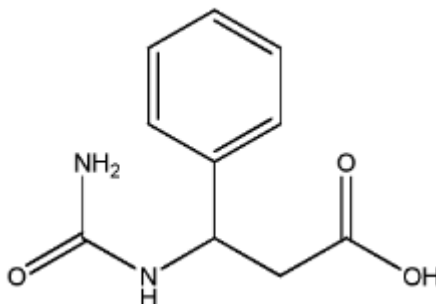
15 Una mezcla de ácido para-fluoro-trans-cinámico (1,00 g, 6,67 mmol) y urea (2,00 g, 33,5 mmol) se calentó a 210 °C durante 30 minutos. Esto dio como resultado la formación de un líquido homogéneo de color amarillo. Por cada hora que la reacción transcurrió se añadió más cantidad de urea (0,40 g, 6,67 mmol). Después de agitar durante 4 horas, se añadió agua hirviendo (20 ml) y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1 hora más a 95 °C. Tras la extracción del sólido residual de la mezcla de reacción mediante filtración en caliente, el precipitado blanco que se formó se aisló mediante filtración, para dar como resultado un sólido de color amarillo (0,75 g, rendimiento = 60 %).  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 2,61 (1 H, dd, J = 6,8, 16,4, CH<sub>2</sub>), 2,84 (1 H, dd, J = 5,8, 16,4, CH<sub>2</sub>), 4,64-4,70 (1 H, m, CHPh), 7,27-7,42 (4H, m, Ph), 8,02 (1 H, s a, CHNHCO), 10,19 (1 H, s a, CONHCO);  $\delta_C$  (100 MHz, DEPT, DMSO- d<sub>6</sub>) 38,2 (CH<sub>2</sub>), 50,0 (CHPh), 126,0 (Ph), 127,6 (Ph), 128,5 (Ph), 141,1 (Ph), 153,8 (NHCONH), 169,7 (NHCOCH<sub>2</sub>); R<sub>t</sub> 10,5 y 15,1 minutos (quirobiótico T, tampón acetato de amonio pH 5,5; metanol 7:3, 1,0 ml/minuto).

20 e) Síntesis de (±)-3-bromo-6-fenildihidouracilo de acuerdo con la siguiente fórmula:



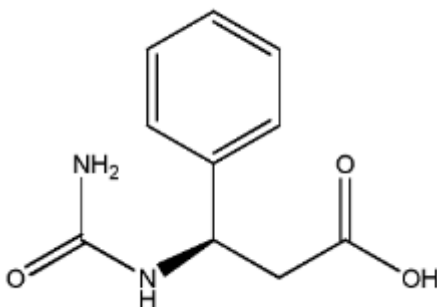
Una mezcla de ácido meta-bromo-trans-cinámico (0,80 g, 3,5 mmol) y urea (1,26 g, 21 mmol) se calentó a 210 °C. Esto dio como resultado la formación de un líquido homogéneo de color amarillo. Se añadió más cantidad de urea (0,25 g, 4,2 mmol) por cada hora que la reacción transcurrió. Tras agitar durante cuatro horas, se añadió agua hirviendo (20 ml) y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1 hora más a 95 °C. Tras la extracción del sólido residual de la mezcla de reacción mediante filtración en caliente, el precipitado blanco que se formó se aisló mediante filtración, para dar como resultado un sólido de color amarillo (0,30 g, rendimiento = 32 %).  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) 2,66 (1 H, dd,  $J = 6,8, 17,4$ ,  $\text{CH}_2$ ), 2,84 (1 H, dd,  $J = 5,6, 16,3$ ,  $\text{CH}_2$ ), 4,64-4,74 (1 H, m,  $\text{CHPh}$ ), 7,29-7,59 (4H, m, Ph), 8,04 (1 H, s a,  $\text{CHNHCO}$ ), 10,23 (1 H, s a,  $\text{CONHCO}$ );  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz, DEPT, DMSO- $d_6$ ) 37,8 ( $\text{CH}_2$ ), 49,5 ( $\text{CHPh}$ ), 121,1 (Ph), 125,2 (Ph), 129,0 (Ph), 130,5 (Ph), 130,8 (Ph), 143,9 (Ph), 153,7 ( $\text{NHCONH}$ ), 169,6 ( $\text{NHCOCH}_2$ );  $R_t$  16,3 y 25,1 minutos (quirobiótico T, tampón acetato de amonio pH 5,5: metanol 7:3, 1,0 ml/minuto).

f) Síntesis de ( $\pm$ )-N-carbamoil- $\beta$ -fenilalanina



A una solución en agitación de ( $\pm$ )- $\beta$ -fenilalanina (0,80 g, 4,85 mmol) en agua caliente (20 ml) se añadió una solución de cianato de potasio (0,60 g, 7,40 mmol) en agua (2 ml). Tras agitar durante 1 hora a 90 °C, la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente antes de acidificarse usando ácido clorhídrico concentrado ( $\text{pH} > 1$ ). Tras reposar, se formó un precipitado de color blanco, que se aisló mediante filtración y se recristalizó en agua hirviendo para dar como resultado un sólido cristalino de color blanco (0,71 g, 71 %).  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) 2,63 (2H,  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ), 5,00 (1 H, dd,  $J = 7,2, 8,7$ ,  $\text{CHNH}$ ), 5,56 (2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 6,57 (1H, d, 8,7,  $\text{CHNH}$ ), 7,18-7,34 (5H, m, Ph);  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz, DEPT, DMSO- $d_6$ ) 41,4 ( $\text{CH}_2$ ), 50,0 ( $\text{CHPh}$ ), 126,3 (Ph), 126,7 (Ph), 128,1 (Ph), 143,4 (Ph), 157,8 ( $\text{NHCONH}$ ), 172,0 ( $\text{NHCOCH}_2$ );  $R_t$  3,1 y 3,4 minutos (quirobiótico T, tampón acetato de amonio pH 5,5: metanol 7:3, 1,0 ml/minuto).

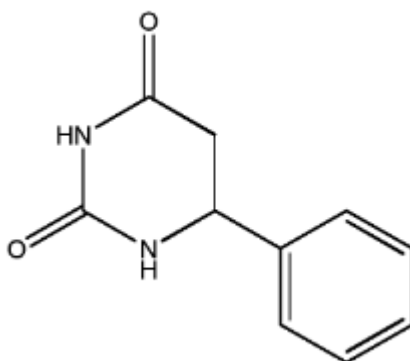
g) Síntesis de (R)-N-carbamoil- $\beta$ -fenilalanina de acuerdo con la siguiente fórmula:





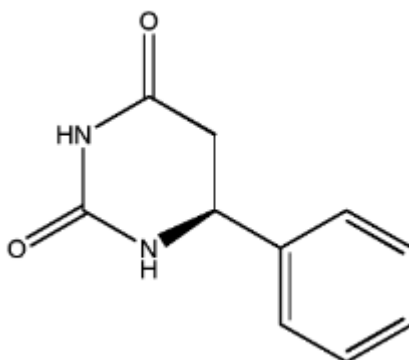
5 A una solución en agitación de  $\beta$ -fenilalanina (0,4 g, 2,43 mmol) en agua caliente (10 ml) se añadió una solución de cianato de potasio (0,3 g, 3,70 mmol) en agua (1 ml). Tras agitar durante 1 hora a 90 °C, la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente antes de acidificarse usando ácido clorhídrico concentrado (pH > 1). Tras reposar, se formó un precipitado de color blanco, que se aisló mediante filtración y se recrystalizó en agua hirviendo para dar como resultado un sólido cristalino de color blanco (0,30 g, 60 %);  $\delta_H$  y  $\delta_C$  del análisis idénticos a los de ( $\pm$ )-46;  $R_t$  3,4 minutos (quirobiótico T, tampón acetato de amonio pH 5,5: metanol 7:3, 1,0 ml/minuto).

h) Síntesis de ( $\pm$ )-6-fenildihidouracilo (de acuerdo con la fórmula siguiente) a partir de ( $\pm$ )-N-carbamoyl- $\beta$ -fenilalanina



10 Una solución de ( $\pm$ )-N-carbamoyl- $\beta$ -fenilalanina (100 mg, 0,48 mmol) en ácido clorhídrico concentrado (5 ml) se agitó durante 4 horas a 135 °C. Después de ese período, el volumen de la mezcla de reacción se había reducido en un 75 %, y la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. Tras reposar, se formó un precipitado de color blanco, que se aisló mediante filtración para dar como resultado un sólido cristalino de color blanco (50 mg, 55 %); análisis idéntico a ( $\pm$ )-45.

15 i) Síntesis de (S)-6-fenildihidouracilo de acuerdo con la siguiente fórmula:



20 A una solución en agitación de (S)- $\beta$ -fenilalanina (100 mg, 0,60 mmol) en agua caliente (2 ml) se añadió una solución de cianato de potasio (75 mg, 0,93 mmol) en agua (0,5 ml). Tras agitar durante 1 h a 90 °C, se añadió ácido clorhídrico concentrado (2 ml), la reacción se agitó durante 2 h a 135 °C. Tras dicho tiempo, el volumen de mezcla se había reducido en un 75 %, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Tras reposar, se formó un precipitado de color blanco, que se aisló mediante filtración para dar como resultado un sólido cristalino de color blanco (55 mg, 48 %);  $\delta_H$  y  $\delta_C$  del análisis idénticos a los de ( $\pm$ )-45;  $R_t$  9,6 minutos (quirobiótico T, tampón acetato de amonio pH 5,5: metanol 7:3, 1 ml/minuto).

### 25 Ejemplo 6: Aislamiento del educto y producto de una reacción con hidantoinasa

La unión de 6-PDHU y NCBPA a Q Sepharose y DEAE Sepharose se sometió a ensayo en microcaps (Eppendorf). 1 ml de Q Sepharose o DEAE Sepharose (suspensión comercialmente disponible en etanol) se lavó con agua (3x1 ml) antes de añadir una solución (1 ml) que contiene NCBPA 2,5 mM NCBPA y 6-PDHU 2,5 mM, el microcap se sometió a vortización antes de extraer una alícuota del sobrenadante. El porcentaje de NCBPA y 6PDHU en el sobrenadante se determinó mediante rPHPLC y se muestran en la Tabla 2:

30

Tabla 2:

Tipo de resina	Porcentaje de sobrenadante (%)	
	NCBPA	6PDHU
Q	38	58
DEAE	22	67

La unión a ambas resinas es rápida, donde Q une menos de N-carbamoil-β-fenilalanina y menos de 6-fenildihidouracilo que DEAE, haciendo que DEAE sea más favorable como resina de intercambio aniónico para la separación.

#### Ejemplo 7: HPLC quiral en fase invertida

Para la rpHPLC, se usaron las siguientes columna, tampón, y condiciones de análisis:

Astec Chirobiotic™ T 25 cm x 4,6 mm, 5 μm (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.)  
Tampón acetato de amonio (pH 5.5): Metanol, 70:30, 25 °C, 0,5 ml/min

#### Ejemplo 8: Separación de la enzima sustrato y producto mediante cromatografía DEAE

Se preparó una columna a partir de una jeringa invertida, bloqueada con lana de vidrio y rellena con DEAE (4 ml) que se había lavado con 10 volúmenes de columna de dH<sub>2</sub>O. Tras el equilibrio con tampón acetato de amonio 200 mM (pH 4), una mezcla sintética de NCBPA (2,5 mM), 6PDHU (2,5 mM) y enzima (7 mg/ml) en H<sub>2</sub>O se aplicó a la columna y el flujo a su través se analizó mediante rpHPLC (detección 6PDHU/NCBPA) y ensayo de Bradford (detección de enzima). Después de todo, Después de que todo el 6PDHU se hubo lavado de la columna, El NCBPA se eluyó de la columna usando acetato de amonio 200 mM (pH 8,17). Los resultados se muestran en la Fig. 3 (en la que los cuadrados representan 6-PDHU; los rombos representan NCBPA, y los triángulos representan enzima, 6-PDHU y NCBPA se indican en mM, la enzima se indica en mg/l). A un pH de 4 hay una separación evidente entre NCBPA y 6PDHU, permitiendo la recuperación del 90 % de NCBPA.

#### Ejemplo 9: Hidantoinasa catalizó la hidrólisis de dihidouracilos racémicos 6-sustituídos

Inicialmente, la hidantoinasa (obtenida de Sigma, St. Louis, EE.UU.) catalizó la hidrólisis de (±)-6-PDHU (6-fenildihidouracilo racémico) (4<sup>a</sup> en la Fig. 2: R = Ph) que se estudió como un sistema modelo. Las reacciones se llevaron a cabo a una concentración de sustrato de 5 mM en tampón Tris [pH 7,5] y se controló mediante HPLC quiral en fase invertida como se describe en el Ejemplo 7, que permite la determinación simultánea tanto de la extensión de la conversión en la reacción y también el exceso enantiomérico del dihidouracilo 4<sup>a</sup> sin reaccionar y el derivado de N-carbamóilo 5 (Fig. 4, véase también el Esquema 2). Se indicaron las siguientes observaciones:

- (i) se descubrió que la enzima hidantoinasa era muy selectiva para el enantiómero (S) de 6-PDHU (4<sup>a</sup>) con un valor de E >100. La configuración absoluta tanto del producto (S)-N-carbamoil-β-fenilalanina [(S)-NCBPA] como el sustrato sin reaccionar @-6-DPHU se asignaron por comparación con muestras auténticas;
- (ii) a pesar de la elevada (S)-enantioselectividad observada, las conversiones no avanzaron hasta el 50 %, incluso después de tiempos de reacción prolongados. Todas las reacciones proporcionaron una concentración en equilibrio de 6-PDHU:(S)-NCBPA = 51:49. El exceso enantiomérico de (S)-NCBPA superó el 96 % durante todo el período de observación. La Fig. 5 muestra los resultados obtenidos a partir de una reacción de 25 ml en un reactor pequeño, en el que los rombos representan la concentración de NCBPA [mM], los cuadrados representan la concentración de 6-DPHU [mM], y las cruces representan el exceso enantiomérico [%]
- (iii) la reacción inversa, concretamente la ciclación de N-carbamoil-β-fenilalanina, tenía aparentemente una tasa relativa con respecto a la hidrólisis y también era muy selectiva para (S) sin ciclación apreciable del enantiómero @. La Fig. 6 muestra la conversión de (+/-)-, (S)-NCBPA y @-NCBPA con y sin la enzima, en la que los rombos rellenos o sin rellenar unidos por líneas sólidas representan +/-NCBPA (sin enzima) o +/-NCBPA (con enzima), respectivamente, los cuadrados rellenos o sin rellenar unidos por líneas sólidas representan (S)-NCBPA (sin enzima) (S)-NCBPA (con enzima), respectivamente, y triángulos rellenos o sin rellenar unidos por líneas sólidas representan @-NCBPA (sin enzima) o @-NCBPA (con enzima), respectivamente.

#### Ejemplo 10: dependencia del pH de la hidrólisis química de 6-PDHU

6-PDFIU se incubó a 50 °C durante 24 horas en tampón Tris a diferentes valores de pH. Se produjo una notable

hidrólisis de fondo del 6-PDHU con fuerte dependencia del tampón y el pH. En tampón Tris a pH 7, se observó una hidrólisis de fondo del 0,5 %. A pH 9, una hidrólisis de fondo representó hasta aproximadamente un 20 % (Fig. 7).

#### Ejemplo 11: dependencia del pH de la actividad hidantoinasa

5 6-PDHU se incubó en tampón fosfato (0,1 M, dihidrogenofostato de potasio e hidrogenofostato dipotásico, volúmenes ajustados al pH adecuado) o tampón Tris a diferentes valores de pH (hasta 8 h, usando 7 g/l de D-hidantoinasa de Sigma). El mayor índice de conversión se observó en el intervalo de aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente pH 9,0 (Fig. 8, en la que los cuadrados representan en tampón fosfato y los rombos representan el tampón Tris).

10 En un experimento adicional, las tasas de conversión se determinaron para los tampones fosfato o Tris a diferentes valores de pH con el tiempo. 6-PDHU 5 mM se incubó en tampón fosfato (pH 6,0, 7,0, 7,5, 8,0) y tampón Tris (pH 7,5) durante 22 horas. Los resultados se muestran en la Fig. 9 (en la que los rombos, cuadrados, triángulos y cruces representan el tampón fosfato a pH 6, pH 7, pH 7,5 o pH 8, respectivamente, y los puntos representan tampón Tris a pH 7,5) y la Tabla 3 (ee = exceso enantiomérico [%]).

Tabla 3:

Tampón	pH	ee
Fosfato	6,00	>99,90
Fosfato	7,00	>99,90
Fosfato	7,50	96,62
Fosfato	8,00	92,73
Tris	7,50	>99,90

15 Aunque la conversión transcurre con elevado exceso enantiomérico del sustrato deseado a pH 6,00 en tampón fosfato, la tasa de conversión es considerablemente menor en comparación con las tasas de conversión a valores de pH entre 7,00 y 8,00.

#### Ejemplo 12: Especificidad de sustrato de la hidantoinasa de *Vigna angularis*

20 Se sintetizaron varios sustratos como se describe en el Ejemplo 4 y se sometieron a la conversión catalizada por hidantoinasa [tampón Tris (pH 7,5, 0,1 M, 1,0 ml), D-hidantoinasa, (Sigma, 7 g/l), sustrato (soluciones 5 mM prediseñadas en tampón salvo sustituyente aromático (4<sup>a</sup>, 4b, 4c), en cuyo caso, el sustrato se disolvió en 100 microlitros de DMSO y se añadió a 900 microlitros de tampón)]. La reacción se muestra en la Fig. 10, los resultados se muestran en la Tabla 4, en la que el valor E se define de la siguiente forma:

$$\text{valor E} = (\ln(1-[\text{producto}] \cdot (1+ee)))/(\ln(1-[\text{producto}] \cdot (1-ee)))$$

Tabla 4:

Sustrato	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Procedimiento de síntesis	Rendimiento NCBAA/ %	Rendimiento DHU/ %	Tasa relativa de hidrólisis enzimática	valor E
4 <sup>a</sup>		H	A&B	88	77-82	7	>200
4b	<i>p</i> -F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	B	56	67	15	>100
4c	<i>p</i> -Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	B	71	75	41	>100
4d	Bencilo	H	B	87	58	79	0
4e	H	H	B	55	-	100	-
4f	<i>i</i> -Pr	H	B	80	24	46	3
4g	<i>i</i> -Bu	H	B	68	67	55	2
4h	Me	H	-	-	-	52	5
4i	(Me) <sub>2</sub>	H	B	20	100	0	-
8	H	Me	-	-	-	23	-

**Ejemplo 13: Influencia de codisolventes orgánicos de la conversión catalizada por hidantoinasa**

Las biotransformaciones de 6-PDHU 5 mM se llevaron a cabo a una escala de 5 ml en tampón con un 2 % de DMSO y tampón que se había saturado con cualquiera de MTBE (aproximadamente un 5 % en volumen) o bien butano-2-ol (aproximadamente un 15 % en volumen). Los resultados se muestran en la Fig. 11, en la que los rombos representan tampón, los cuadrados representan tampón que contiene DMSO al 2 %, los triángulos representan tampón que contiene MTBE, y las cruces representan tampón que contiene butano-2-ol. Ni DMSO ni MTBE afectaron notablemente la conversión, mientras que el butano-2-ol redujo la cantidad de NCBPA a la concentración usada.

**Ejemplo 14: Influencia de la cantidad de enzima sobre la conversión y el exceso enantiomérico**

Se llevaron a cabo tres configuraciones de reacción paralelas en un volumen de reacción total de 5 ml de tampón Tris, pH 7,5 cada una, que contenían 6-PDHU 5 mM, a una temperatura de 50 °C. En una reacción, se usó la cantidad habitual de enzimas (7 g/l), mientras que el resto de configuraciones contenía 0,25 equivalentes (1,75 g/l) y 4 equivalentes (28 g/l), respectivamente. La producción de N-carbamoil-β-fenilalanina (NCBPA) y el exceso enantiomérico del enantiómero S se determinaron en diferentes puntos temporales. Los resultados se muestran en la Fig. 12, en la que las columnas rayadas vertical, oblicua u horizontalmente representan la concentración de NCBPA obtenida en la presencia de 0,25, 1 o 4 equivalentes de enzima, respectivamente, y en la que los rombos, cuadrados y triángulos representan el correspondiente exceso enantiomérico en presencia de 0,25, 1 o 4 equivalentes de la enzima, respectivamente.

**Ejemplo 15: Escalado de una reacción catalizada por hidantoinasa**

En tres biotransformaciones realizadas independientemente, 6-PDHU 20 mM se incubaron a 50 °C en un volumen de reacción total de 25 ml de tampón (tampón Tris pH 7,5) y en presencia de 175 mg de hidantoinasa. El pH del tampón se ajustó tras la adición de 6-PDHU y se mantuvo constante durante la reacción mediante la valoración volumétrica automática con NaOH. Se tomaron alícuotas en varios puntos temporales para determinar las concentraciones de NCBPA y el exceso enantiomérico del enantiómero S. Los resultados se muestran en la Fig. 13 y en la Fig. 14, respectivamente. En la Fig. 13, los rombos, cuadrados y triángulos representan el lote del reactor 1, lote del reactor 2 y el lote del reactor 3, respectivamente. En la Fig. 14, los rombos, cuadrados y triángulos representan las tasas de exceso enantiomérico observadas en el lote del reactor 1, lote del reactor 2 y el lote del reactor 3, respectivamente, y en el que las líneas sólidas, punteadas y rayadas representan las curvas del mejor ajuste de las tasas de exceso enantiomérico observadas en el lote del reactor 1, lote del reactor 2 y el lote del reactor 3, respectivamente.

Resumen de las SEQ ID NO:

SEQ ID NO:1 - secuencia peptídica obtenida a partir de la hidantoinasa aislada  
 SEQ ID NO:2 - secuencia peptídica obtenida a partir de la hidantoinasa aislada  
 SEQ ID NO:3 - secuencia peptídica obtenida a partir de la hidantoinasa aislada  
 SEQ ID NO:4 - secuencia peptídica obtenida a partir de la hidantoinasa aislada  
 SEQ ID NO:5 - secuencia peptídica obtenida a partir de la hidantoinasa aislada  
 SEQ ID NO:6 - hidantoinasa de *Glycine max* como secuencia de referencia  
 SEQ ID NO:7 - secuencia peptídica parcial obtenida a partir de la hidantoinasa aislada

Abreviaturas:

NCBPA - N-carbamoil-β-fenilalanina  
 6PDHU - 6-fenildihidouracilo

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> BASF SE  
 <120> Producción biocatalítica de beta aminoácidos  
 <130> M/49278  
 <160> 7  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 <210> 1  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Vigna angularis*  
 <400> 1

ES 2 628 225 T3

Ile Glu Leu Gly Ile Thr Gly Pro Glu Gly Gln Arg Leu Ala Gly Pro  
1 5 10 15

Thr Val Leu

5 <210> 2  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Vigna angularis*  
  
<400> 2

Ile Glu Leu Gly Ile Thr Gly Pro Glu Gly Gln Arg Leu Ala Gly Pro  
1 5 10 15

10 Val Leu

15 <210> 3  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Vigna angularis*  
  
<400> 3

Ile Glu Leu Ile Thr Gly Pro Glu Gly Gln Arg Leu Ala Gly Pro Thr  
1 5 10 15

20 Val Leu

25 <210> 4  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Vigna angularis*  
  
<400> 4

Ile Glu Leu Ile Thr Gly Pro Glu Gly Gln Arg Leu Ala Gly Pro Val

1 5 10 15

Leu

30 <210> 5  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Vigna angularis*  
  
35 <400> 5

Glu Glu Ile Ala Arg Ala Arg Lys Ser Gly Gln Arg Val Ile Gly Glu  
1 5 10 15

Pro Val Ala Ser  
20

ES 2 628 225 T3

<210> 6  
 <211> 525  
 <212> PRT  
 <213> *Glycine max*

5

<400> 6

```

Met  Gln  Phe  Ser  Ile  Thr  Ser  Gln  Phe  Leu  His  Ile  Phe  Ser  Leu  Thr
 1          5          10          15

Ile  Phe  Ile  Ile  Ile  Thr  Ser  Ser  Leu  Ser  Gln  Ser  Ser  Gln  Phe  Cys
          20          25          30

Asp  Ala  Gly  Thr  Glu  Ile  Pro  Ser  Ser  Lys  Leu  Leu  Ile  Lys  Gly  Gly
          35          40          45

Thr  Val  Val  Asn  Ala  Gln  His  His  Gln  Ile  Ala  Asp  Val  Tyr  Val  Glu
          50          55          60

Asp  Gly  Ile  Ile  Val  Ala  Val  Asn  Pro  Asn  Ile  Met  Val  Gly  Asp  Asp
65          70          75          80

Val  Thr  Val  Ile  Asp  Ala  Thr  Gly  Lys  Tyr  Val  Met  Pro  Gly  Gly  Ile
          85          90          95

Asp  Pro  His  Thr  His  Leu  Asp  Met  Asp  Val  Gly  Phe  Thr  Ala  Thr  Val
          100          105          110

Asp  Asp  Phe  Phe  Ser  Gly  Gln  Ala  Ala  Ala  Leu  Ala  Gly  Gly  Thr  Thr
          115          120          125

Met  His  Ile  Asp  Phe  Val  Ile  Pro  Leu  Asn  Gly  Ser  Leu  Thr  Ala  Gly
130          135          140
    
```

ES 2 628 225 T3

Phe Glu Asp Tyr Glu Lys Lys Ala Lys Lys Ser Cys Met Asp Tyr Gly  
 145 150 155 160

Phe His Met Val Ile Thr Lys Trp Asp Glu Thr Val Ser Arg Glu Met  
 165 170 175

Glu Leu Met Val Lys Glu Lys Gly Ile Asn Ser Phe Lys Phe Phe Met  
 180 185 190

Ala Tyr Lys Gly Ile Leu Met Ile Asn Asp Glu Leu Leu Leu Glu Gly  
 195 200 205

Phe Lys Lys Cys Lys Ser Leu Gly Ala Val Ala Met Val His Ala Glu  
 210 215 220

Asn Gly Asp Ala Val Tyr Glu Gly Gln Arg Lys Met Ile Glu Leu Gly  
 225 230 235 240

Ile Thr Gly Pro Glu Gly His Ala Leu Ser Arg Pro Ala Val Leu Glu  
 245 250 255

Gly Glu Ala Thr Ala Arg Ala Ile Arg Leu Ala Asp Phe Val Asn Thr  
 260 265 270

Pro Leu Tyr Val Val His Val Met Ser Ile Asp Ala Met Glu Glu Ile  
 275 280 285

Ala Lys Ala Arg Lys Ala Gly Gln Arg Val Ile Gly Glu Pro Ile Ala  
 290 295 300

Ser Gly Leu Ala Leu Asp Glu Ser Trp Leu Trp His Pro Asp Phe Glu  
 305 310 315 320

Ile Ala Ala Lys Tyr Val Met Ser Pro Pro Ile Arg Lys Arg Gly His  
 325 330 335

Asp Lys Ala Leu Gln Ala Ala Leu Ser Thr Gly Val Leu Gln Leu Val  
 340 345 350

Gly Thr Asp His Cys Ala Phe Asn Ser Thr Gln Lys Ala Arg Gly Ile  
 355 360 365

Asp Asp Phe Arg Lys Met Pro Asn Gly Val Asn Gly Ile Glu Glu Arg  
 370 375 380

Met His Leu Val Trp Asp Ile Met Val Glu Ser Gly Gln Ile Ser Val  
 385 390 395 400

Thr Asp Tyr Val Arg Ile Thr Ser Thr Glu Cys Ala Lys Ile Phe Asn

ES 2 628 225 T3

				405					410					415		
Ile	Tyr	Pro	Arg	Lys	Gly	Ala	Val	Leu	Pro	Gly	Ser	Asp	Ala	Asp	Ile	
			420					425					430			
Ile	Ile	Leu	Asn	Pro	Asn	Ser	Ser	Phe	Glu	Met	Ser	Ala	Lys	Ser	His	
		435					440					445				
His	Ser	Arg	Leu	Asp	Thr	Asn	Val	Tyr	Glu	Gly	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	
	450					455					460					
Lys	Ile	Glu	Val	Thr	Ile	Ala	Gly	Gly	Arg	Val	Val	Trp	Glu	Asn	Asn	
465					470					475					480	
Glu	Leu	Lys	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Gly	Arg	Tyr	Ile	Gln	Met	Pro	Pro	
				485					490					495		
Phe	Ser	Tyr	Leu	Phe	Asp	Gly	Leu	Asp	Lys	Lys	Asp	Ala	Ile	Tyr	Leu	
			500					505					510			
Asn	Ser	Leu	Gln	Ala	Pro	Val	Lys	Arg	Ala	Lys	Ala	Ser				
		515					520					525				

<210> 7  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Vigna angularis*

5

<400> 7

Ile	Thr	Gly	Pro	Glu	Gly	Gln	Arg	Leu	Ala	Gly	Pro
1				5					10		

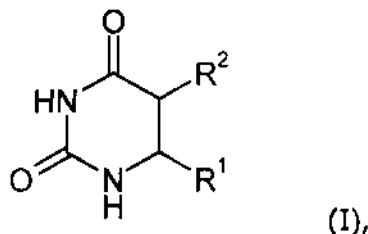
10



## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción biocatalítica de un precursor de  $\beta$ -aminoácidos, que comprende:

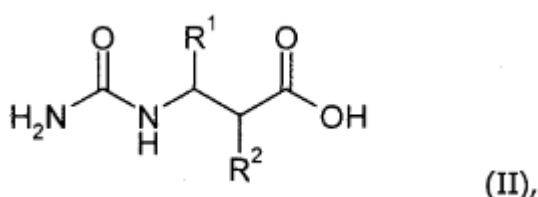
hacer reaccionar al menos un sustrato de la fórmula general (I)



en la que  $R^1$  y  $R^2$  independientemente entre sí se seleccionan entre:

- 5        hidrógeno;  
 un grupo alquilo inferior lineal o ramificado opcionalmente sustituido;  
 un grupo alqueno inferior lineal o ramificado opcionalmente sustituido;  
 un grupo alquilo cíclico opcionalmente sustituido;  
 un grupo arilo monocíclico o policíclico opcionalmente sustituido;  
 10       un grupo heteroarilo monocíclico o policíclico opcionalmente sustituido;  
 un grupo alcoxi lineal o ramificado opcionalmente sustituido;  
 un grupo amino;  
 un grupo alquilamino lineal o ramificado opcionalmente sustituido;  
 un grupo alquiltio lineal o ramificado opcionalmente sustituido;  
 15       un grupo acilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido,  
 un grupo carboxilo o  
 un grupo aldehído;

20       estando dicho sustrato presente en forma estereoisoméricamente pura o en forma de una mezcla de estereoisómeros, en el que la forma estereoisoméricamente pura o la mezcla de estereoisómeros pueden ser opcionalmente una sal,  
 en presencia de al menos una enzima, que cataliza la escisión hidrolítica de una hidantoina y/o un anillo de dihidropirimidina,  
 de forma que un precursor de un  $\beta$ -aminoácido de la fórmula general (II)

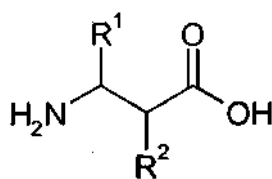


25       en la que  $R^1$  y  $R^2$  se identifican como anteriormente,  
 se produce;  
 estando **caracterizado dicho procedimiento porque** dicha al menos una enzima que se aplica en dicho procedimiento es una hidantoinasa y/o dihidropirimidinasa y se obtiene de *Vigna angularis* y comprende al menos una de las siguientes secuencias parciales:

ITGPEGQRLAGP (SEQ ID NO:7)  
 EEIARARKSGQRVIGEPVAS (SEQ ID NO:5)

y, estando adicionalmente **caracterizado por** convertir un compuesto de la fórmula (I) anterior en un compuesto de la fórmula (II) anterior, en la que  $R^2$  es H y  $R^1$  es diferente de H, con un valor de ee mayor del 93 %.

35       2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además convertir dicho precursor de un  $\beta$ -aminoácido de fórmula (II) en el correspondiente  $\beta$ -aminoácido de la fórmula (III)



(III),

en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> tienen el mismo significado que se define en la Reivindicación 1.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la conversión del precursor de un β-aminoácido se produce a un pH ácido.
- 5 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R<sup>1</sup> es H y R<sup>2</sup> es un grupo arilo opcionalmente sustituido.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la reacción se lleva a cabo en una mezcla de reacción tamponada con Tris o tamponada con borato, preferentemente una mezcla de reacción tamponada con Tris.
- 10 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la reacción se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 11,0, preferentemente a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 10,0, y especialmente preferida a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la reacción se lleva a cabo en presencia de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % de dimetilsulfóxido, preferentemente en presencia de aproximadamente 10 % de dimetilsulfóxido.
- 15 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 60 °C, preferentemente de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C, y en especial de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C.
- 20 9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la reacción se lleva a cabo desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 25 horas, preferentemente de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 10 horas, y en especial de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas.
- 25 10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el al menos un sustrato se selecciona entre un dihidrouracilo, que está monosustituido en la posición 5 o en la posición 6, en especial 6-fenildihidrouracilo, 4-fluoro-6-fenildihidrouracilo, 3-bromo-6-fenildihidrouracilo, 5-metildihidrouracilo y 6-metildihidrouracilo.
- 30 11. Un procedimiento de fabricación de péptidos o principios farmacéuticamente activos estables a la hidrólisis, en particular antibióticos, antineoplásicos, antitrombóticos, insecticida antifúngico, antihelmíntico, antagonistas no peptídicos de la integrina, alcaloides y/o agentes citotóxicos, procedimiento que comprende la preparación de un precursor de β-aminoácidos o un β-aminoácido mediante un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, y posteriormente convertir dicho producto en dicho péptido o principio farmacéuticamente activo estable.

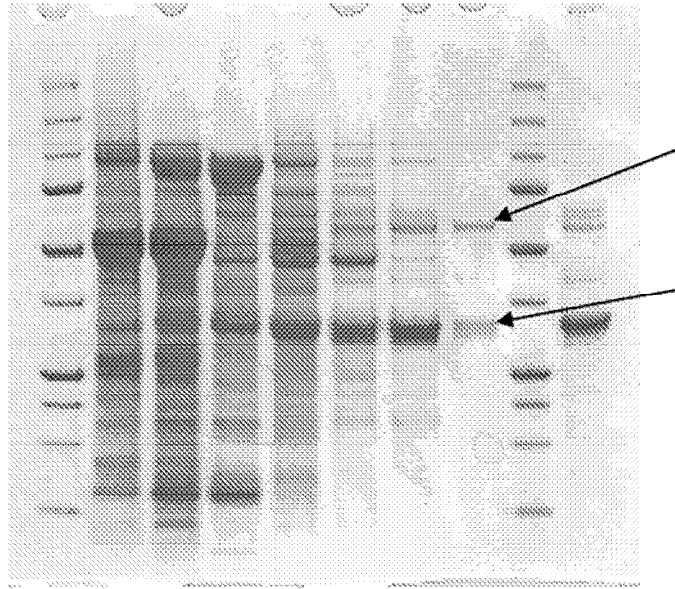


Fig. 1

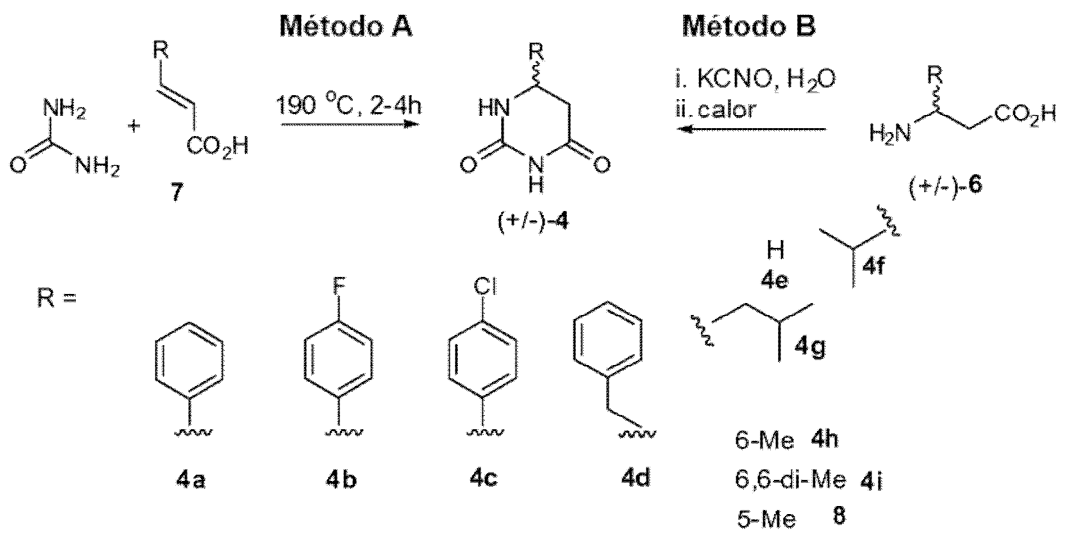


Fig. 2

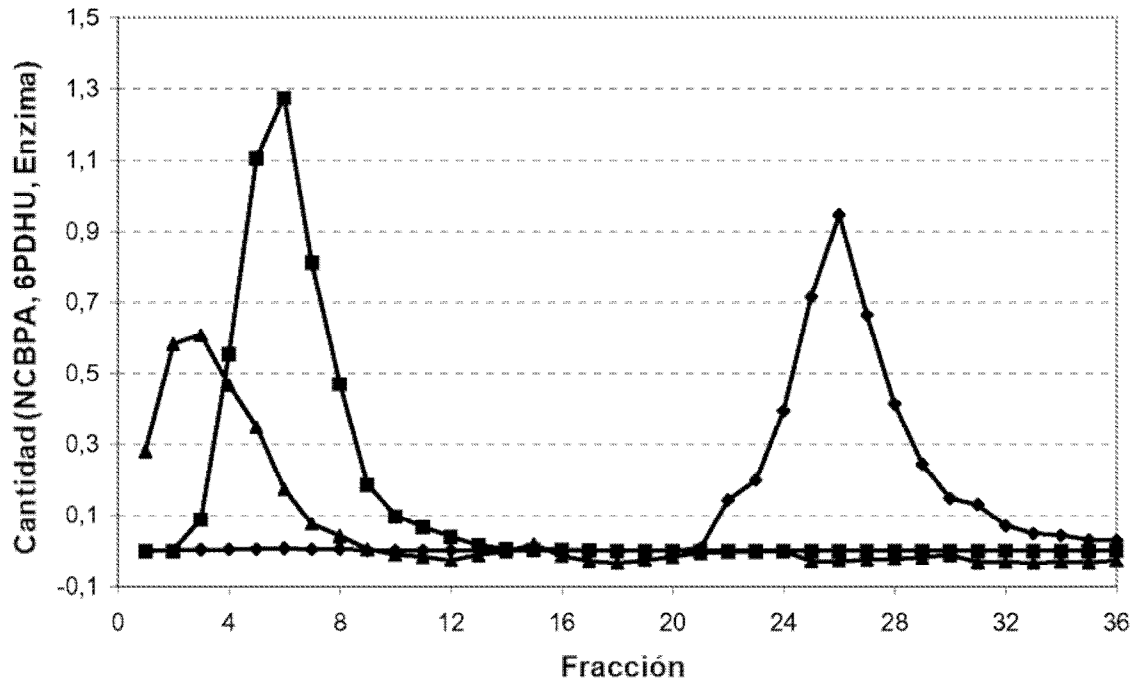


Fig. 3

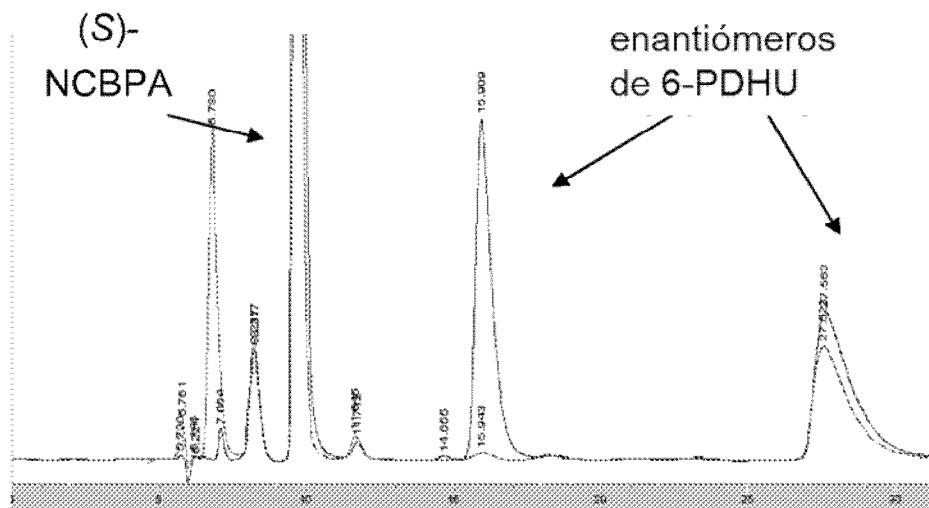


Fig. 4

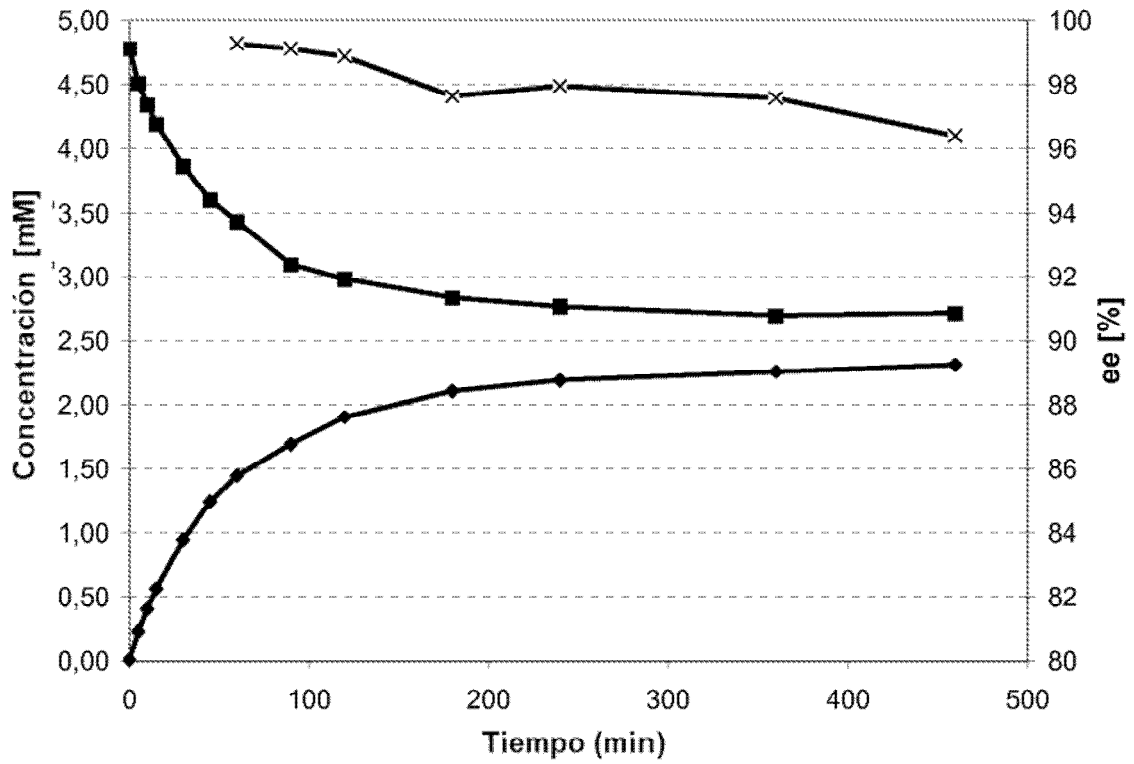


Fig. 5

Conversión de (+/-)-, (S)- y (R)-NCBPA con y sin enzima

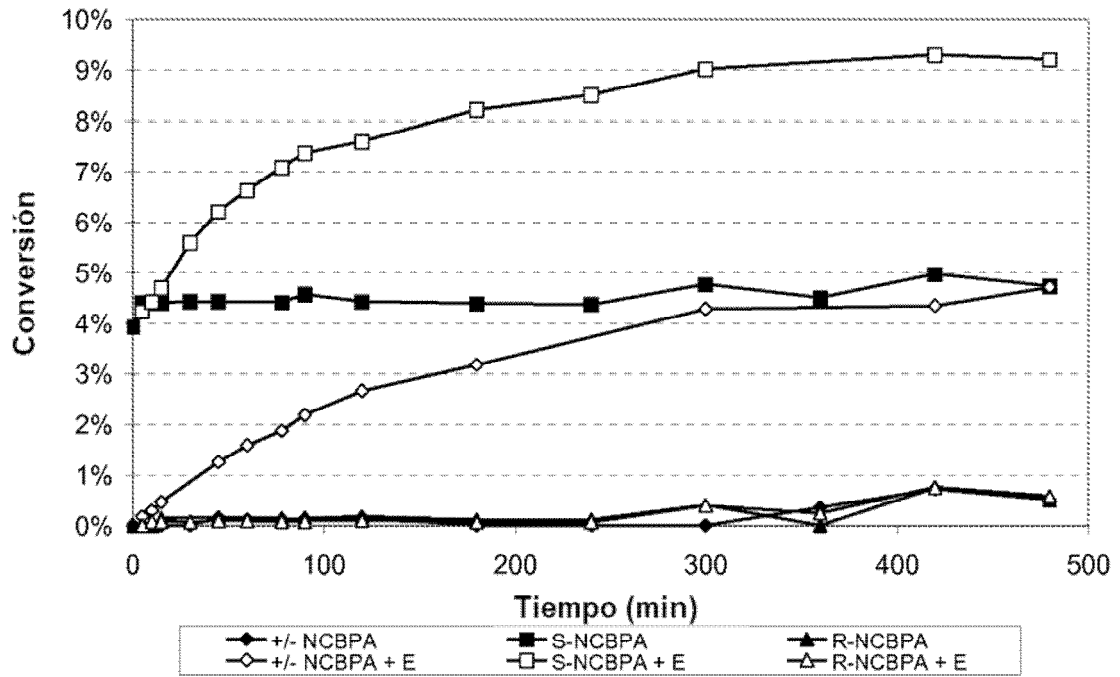


Fig. 6

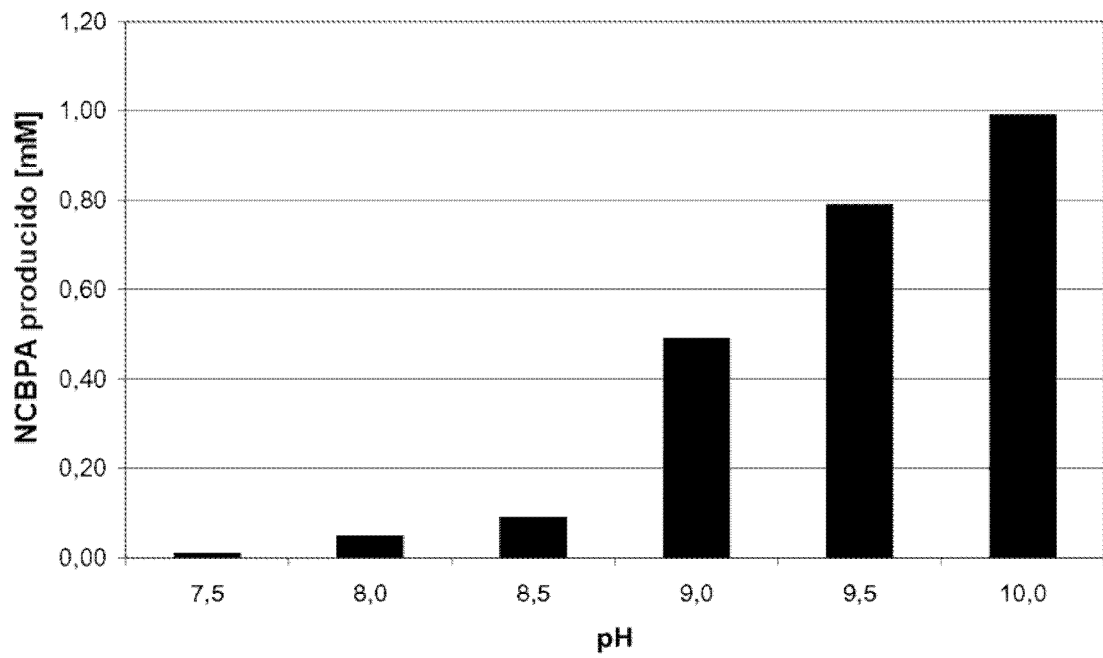


Fig. 7

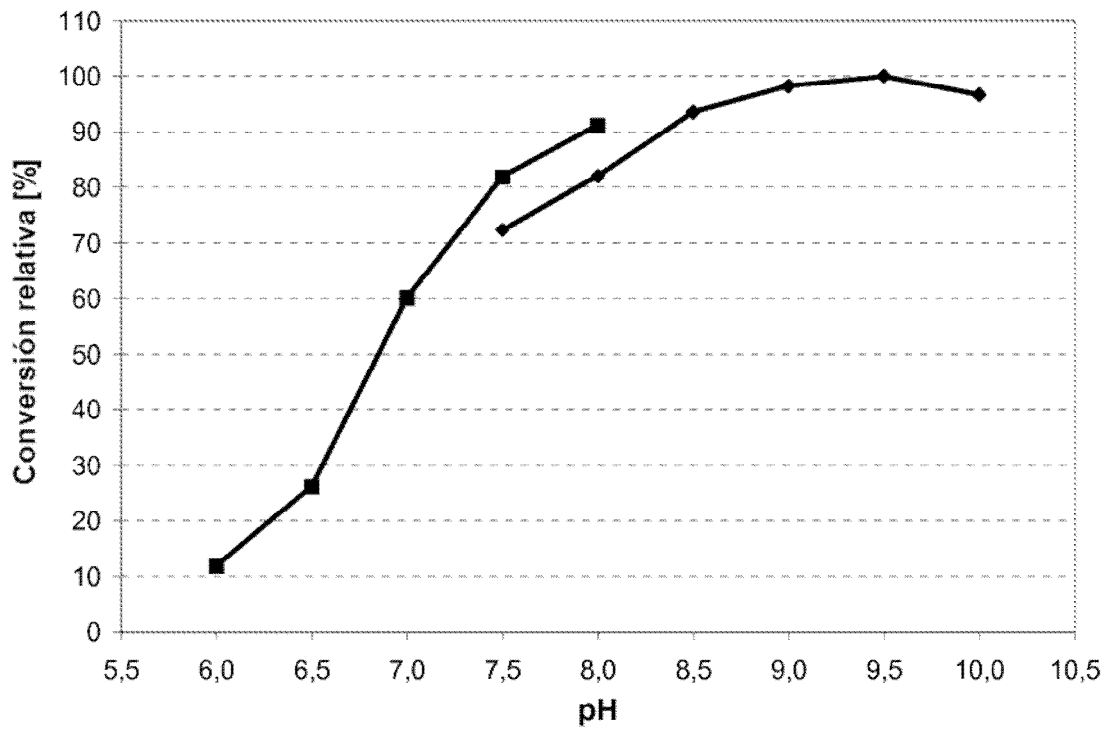


Fig. 8

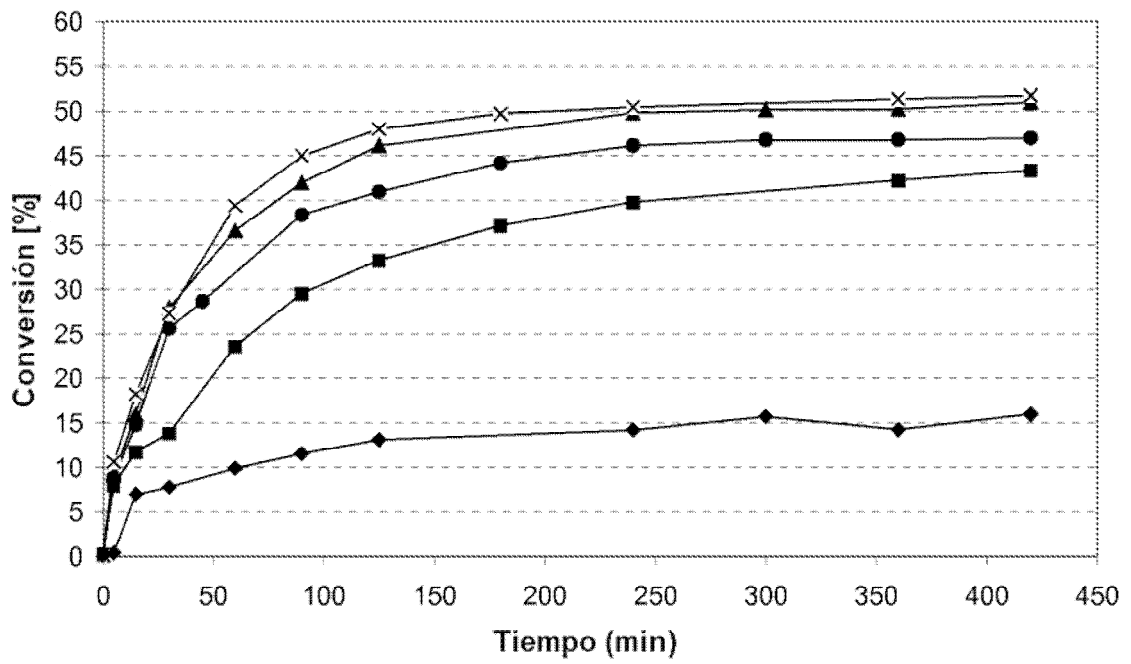


Fig. 9

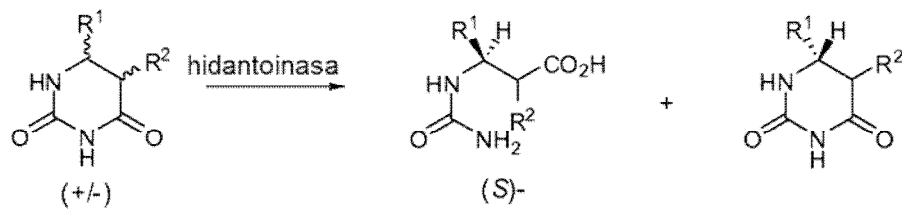


Fig. 10

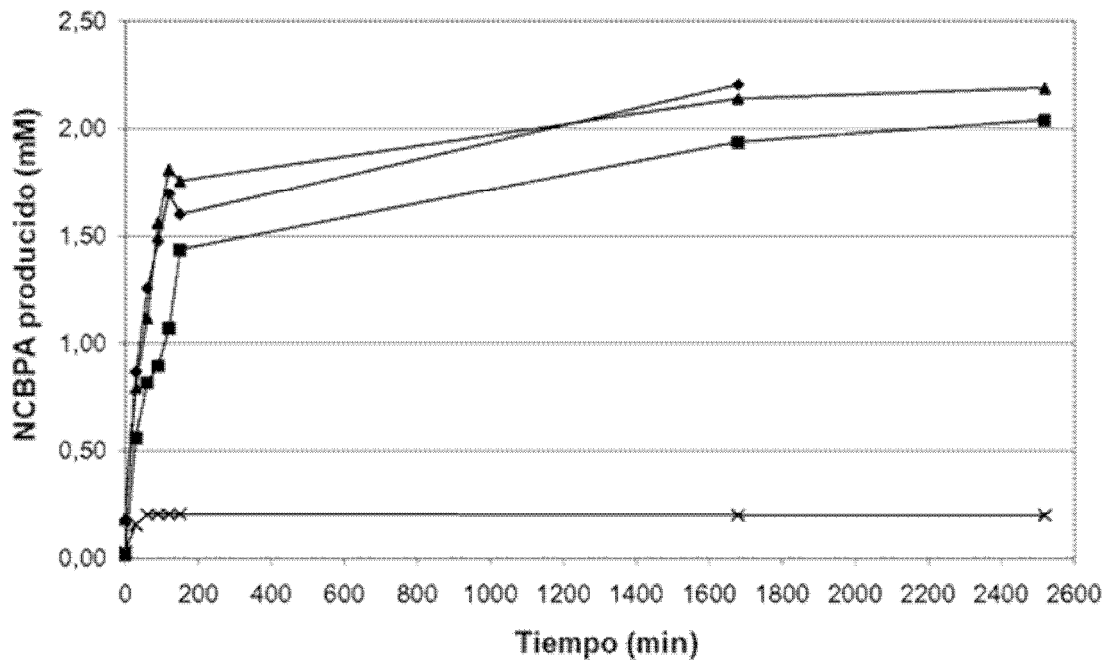


Fig. 11

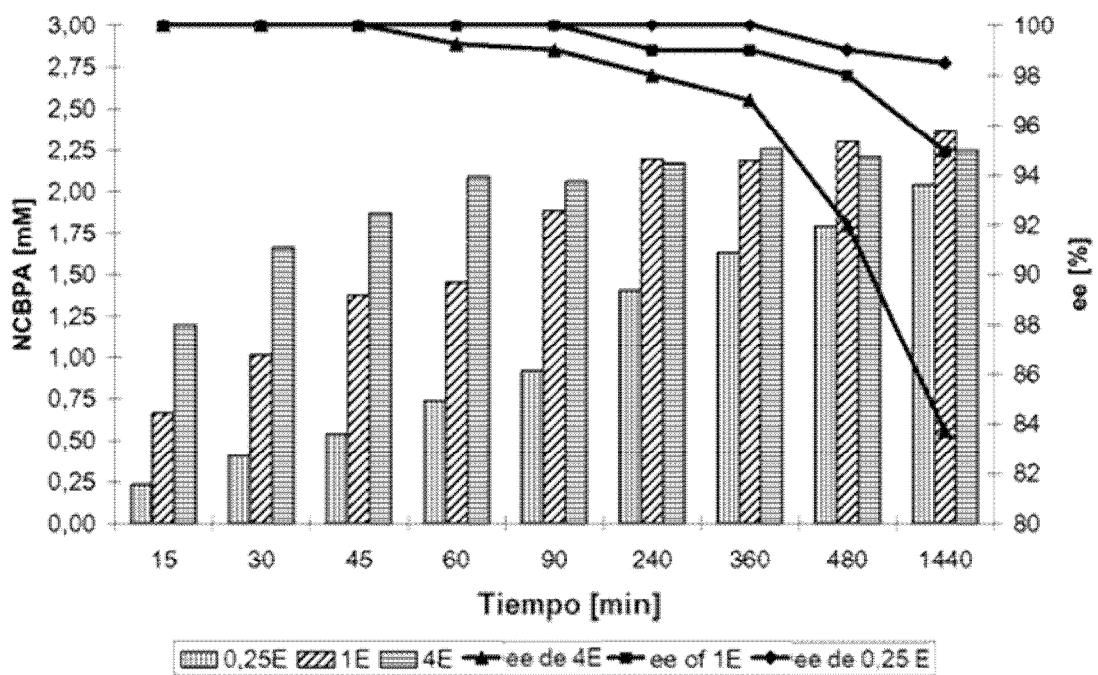


Fig. 12



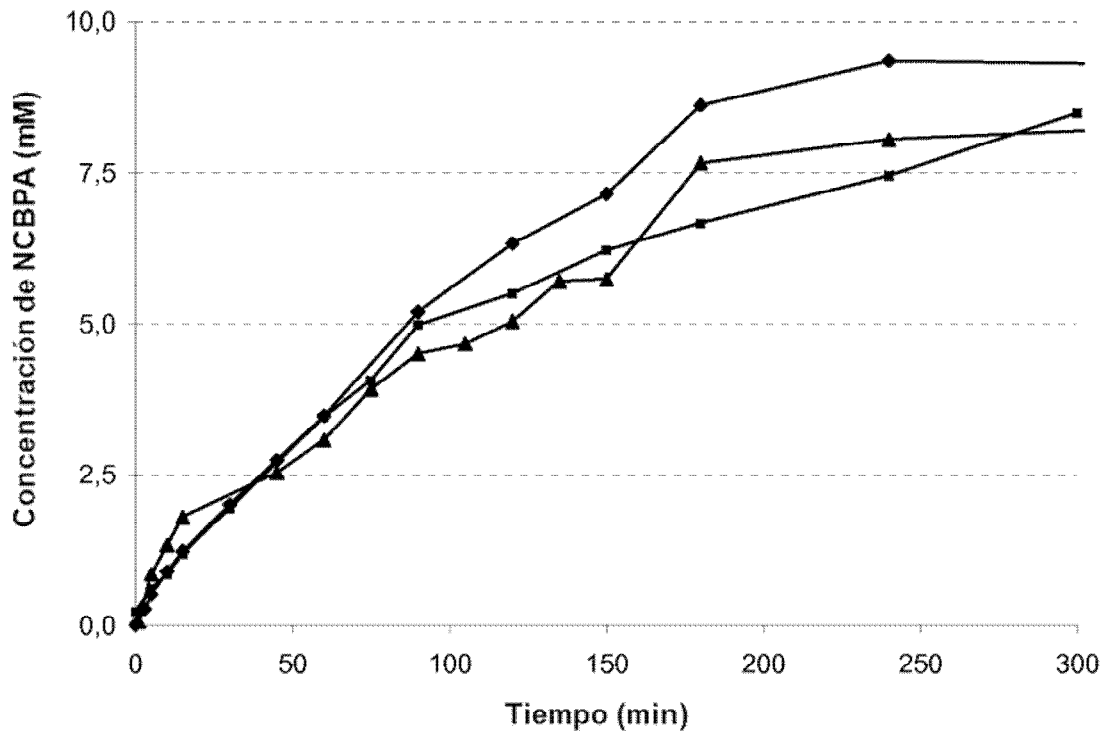


Fig. 13

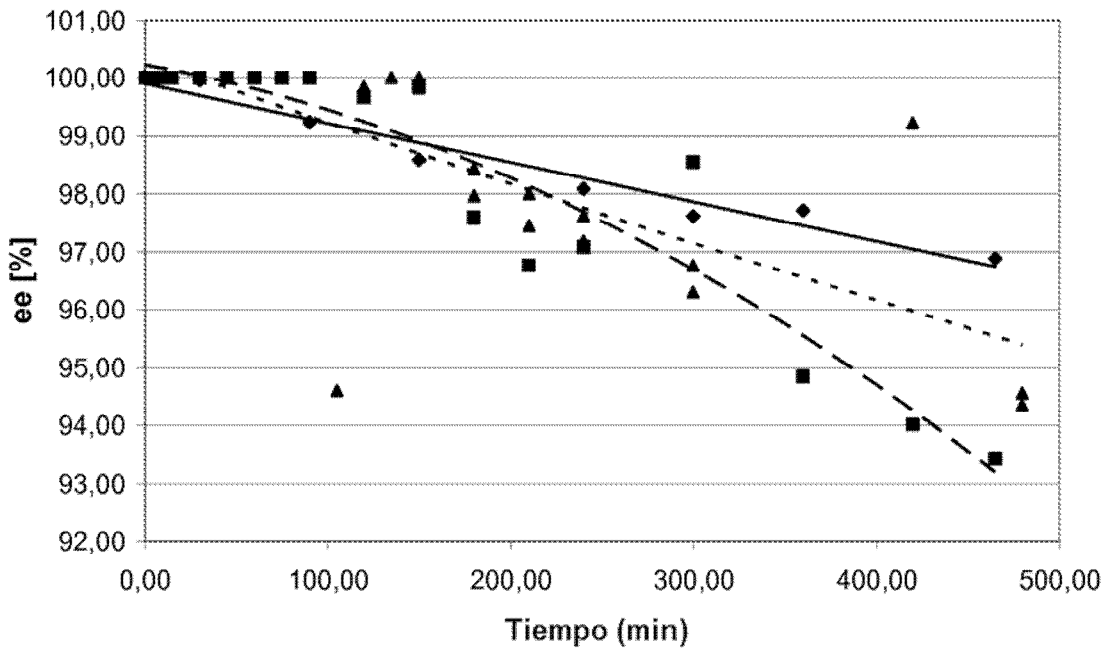


Fig. 14