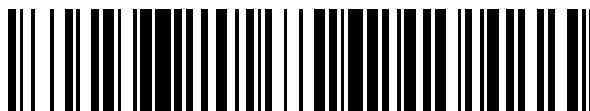


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 473**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/16 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
C12P 7/22 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12P 7/02 (2006.01)
C12P 7/24 (2006.01)
C12P 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2010 PCT/EP2010/052701**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10100195**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2010 E 10706255 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2403953**

54 Título: **Procedimiento para la reducción enzimática estereoselectiva de compuestos cetónicos**

30 Prioridad:

05.03.2009 EP 09450050

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

05.10.2017

73 Titular/es:

**CAMBREX IEP GMBH (100.0%)
Rheingaustrasse 190-196
65203 Wiesbaden, DE**

72 Inventor/es:

**GUPTA, ANTJE;
DUPONT, MARIA y
TSCHENTSCHER, ANKE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 636 473 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la reducción enzimática estereoselectiva de compuestos cetónicos

La presente invención se refiere a un procedimiento para la reducción enzimática estereoselectiva, en particular enantioselectiva de compuestos cetónicos para dar los correspondientes compuestos de hidroxilo quirales, en el que los compuestos cetónicos se reducen con una oxidorreductasa enantioselectiva, específica de NADH. La invención se refiere en particular al uso de oxidorreductasas seleccionadas en este procedimiento.

Los compuestos de hidroxilo ópticamente activos son módulos quirales valiosos con amplia aplicación para la síntesis de compuestos farmacológicamente activos, sustancias aromáticas, feromonas, compuestos agroquímicos e inhibidores de enzimas. A este respecto se registra en particular en el sector farmacéutico una necesidad creciente de compuestos quirales y por consiguiente tecnologías de síntesis quirales, dado que en el futuro ya apenas se usarán como fármacos los compuestos racémicos.

La reducción asimétrica de compuestos cetónicos proquirales es un sector de la catálisis estereoselectiva, en el que la biocatálisis representa una tecnología de competencia eficiente con respecto a la catálisis química. La hidrogenación asimétrica química requiere el uso de catalizadores de metales pesados con alto grado de toxicidad y contaminantes, de condiciones de reacción extremas y por consiguiente que requieren mucha energía así como grandes cantidades de disolventes orgánicos. Además, estos procedimientos están caracterizados con frecuencia por reacciones secundarias y excesos enantioméricos insuficientes.

Las reducciones de compuestos cetónicos proquirales para dar compuestos de hidroxilo y las oxidaciones que transcurren a la inversa se producen en la naturaleza en numerosas rutas bioquímicas, tanto en el metabolismo primario como en el metabolismo secundario, en cualquier organismo y se catalizan por distintos tipos de alcoholdehidrogenasas secundarias (ADH) y oxidorreductasas. Por regla general, estas enzimas dependen de cofactores.

En distintos proyectos de secuenciación se identificaron para distintos organismos en cada caso numerosas secuencias de aminoácidos, en el caso de las cuales se trata supuestamente de oxidorreductasas de actividad, función y enantioselectividad o quimioselectividad desconocida. La idoneidad básica de oxidorreductasas para su uso en procedimientos industriales pudo demostrarse recientemente por medio de numerosos ejemplos.

Recientemente pudo mostrarse que el uso de oxidorreductasas aisladas en sistemas de dos fases acuoso/orgánicos con disolventes orgánicos es posible de manera sumamente eficaz, económica y también en altas concentraciones (> 5%). En los sistemas descritos, a este respecto el compuesto cetónico que va a reducirse, en la mayoría de los casos poco soluble en agua forma junto con el disolvente orgánico la fase orgánica. Parcialmente puede prescindirse también del propio disolvente orgánico. En este caso se forma entonces la fase orgánica por el compuesto cetónico que va a reducirse (documento EP 1 383 899). La regeneración de coenzimas se realiza mediante la oxidación simultánea de alcoholes secundarios, usándose en la mayoría de los casos el 2-propanol miscible con agua, económico (documento WO 2006/087235). Igualmente es ventajoso el uso de 2-metil-4-pentanol o 2-octanol para la regeneración de los cofactores NADH o NADPH (documento WO 2007/036257).

En la bibliografía de los últimos años se encuentran numerosas oxidorreductasas de distinta especificidad y selectividad. Se encuentran distintos ejemplos de oxidorreductasas y deshidrogenasas S-específicas de alta enantioselectividad, que usan casi excepcionalmente NADH como cofactor y por tanto pueden usarse de manera muy económica en condiciones de procedimiento anteriormente descritas. Ejemplos de tales oxidorreductasas S-específicas son las carbonilreductasas de *Candida parapsilosis* (CPCR) (documentos US 5.523.223 y US 5.763.236; Enzyme Microb. Technol. Nov 1993; 15(11):950-8) y *Pichia capsulata* (documento DE 10327454.4), carbonilreductasas de *Rhodococcus erythropolis* (RECR) (documento US 5.523.223), *Nocardia fusca* (Biosci. Biotechnol. Biochem., 63(10) (1999), pág. 1721-1729; Appl. Microbiol. Biotechnol. sept 2003; 62(4):380-6; Epub 26 de abril de 2003) y *Rhodococcus ruber* (J. Org. Chem. 24 de enero de 2003; 68(2):402-6). Además se describen carbonilreductasas S-específicas de *Rhodotorula mucillaginosa*, *Microbacterium spec.*, *Gordonia rubripertincta*, *Pichia stipitis* y *Pichia trehalophila* (documento WO 2007/012428).

Ejemplos de alcoholdehidrogenasas secundarias R-específicas se describen de organismos del género *Lactobacillus*: *Lactobacillus kefir* (documento US 5.200.335), *Lactobacillus brevis* (documento DE 19610984 A1; Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. dic 2000; 56 Pt 12:1696-8), *Lactobacillus minor* (documento DE 10119274) y *Leuconostoc carnosum* (documento WO 2007/012428). Estas enzimas tienen todas el inconveniente de que como cofactor se requiere NADPH, que es esencialmente más caro que NADH y por consiguiente implica costes de procedimiento proporcionalmente altos.

Por oxidorreductasas "R-específicas" se entiende aquellas que reducen compuestos de carbonilo no sustituidos, tales como por ejemplo 2-butanona, 2-octanona o acetofenona, para dar los correspondientes compuestos de R-hidroxilo, o sea R-2-butanol, R-2-octanol y R-2-feniletanol. El éster de ácido 4-halo-3-oxobutírico por ejemplo se reduce por las oxidorreductasas R-específicas para dar el éster de ácido S-4-halo-3-hidroxibutírico.

Las "oxidorreductasas S-específicas" son aquellas ADH que reducen compuestos de carbonilo no sustituidos, tales

como por ejemplo 2-butanona, 2-octanona o acetofenona, para dar los correspondientes compuestos de S-hidroxilo, o sea S-2-butanol, S-2-octanol y S-2-feniletanol. El éster de ácido 4-halo-3-oxobutírico por ejemplo se reduce por oxidorreductasas S-específicas para dar éster de ácido R-4-halo-3-hidroxibutírico.

5 Por el término "específico" ha de entenderse en la presente solicitud que el correspondiente enantiómero se forma en > 95 %.

Además se ha descrito en la bibliografía más reciente una serie de enzimas dependientes de NADPH inespecíficas de levaduras del género *Candida magnoliae* (documentos EP 1152054 A1, WO 2007/033928, WO 2006/046455, WO 2005/033094). Estas tienen, además de la dependencia de NADPH, el gran inconveniente de que no pueden usarse en procedimientos con regeneración de coenzima acoplada a sustrato, sino que siempre requieren para la
10 regeneración de coenzima un segundo sistema de enzima. Preferentemente se usa para ello glucosadeshidrogenasa con glucosa como cosustrato. Además, estas enzimas tienen el inconveniente de que son por regla general inespecíficas, es decir la reducción de compuestos de carbonilo no sustituidos, tal como por ejemplo 2-butanona, 2-octanona o acetofenona, conduce por regla general a alcoholes racémicos; solo en excepciones trabajan estas enzimas de manera selectiva. Por tanto no es posible por regla general con estas
15 enzimas la reducción enantioselectiva de sustratos, tales como éster de ácido 4-halo-3-oxobutírico, 3-oxoésteres o cetonas alifáticas, por ejemplo 2-octanona.

Está a disposición solo un número muy limitado de oxidorreductasas robustas, dependientes de NADH y claramente R-específicas, que pueden usarse en procedimientos con regeneración de coenzimas acopladas con sustrato con alcoholes secundarios, preferentemente 2-propanol, como cosustrato.

20 Una oxidorreductasa R-específica dependiente de NADH se ha descrito por ejemplo de *Pichia finlandica* (documento EP 1179 595 A1). Ésta presenta sin embargo una actividad muy baja con 2-propanol y debido a ello no es adecuada para procedimientos con regeneración de coenzima acoplada con sustrato.

Dos oxidorreductasas R-específicas dependientes de NADH adicionales de *Pichia farinosa* y *Candida nemodendra* se han descrito en el documento WO 2007/012428. En éste pudo mostrarse para la enzima de *Pichia farinosa* que
25 también es posible una regeneración de coenzima con 2-propanol, sin embargo solo en concentraciones hasta el 15 % (v/v) de isopropanol.

Además se conocen enzimas dependientes de NADH de *Leifsonia* (documento US 7.172.894 B2, Biosci. Biotechnol. Biochem., 70 (2), 2006, páginas 418-426) y *Devosia* (documento WO 2004/027055), debiendo ser al menos la enzima de *Leifsonia* R-específica y debiendo ser capaz de regenerar la coenzima acoplada con sustrato.

30 Las oxidorreductasas conocidas actualmente, en particular las enzimas R-específicas de manera unívoca, sin embargo no son suficientes con diferencia para aprovechar todo el potencial en el mercado de reducciones estereoselectivas de compuestos cetónicos. Esto se basa por un lado en que las enzimas individuales disponen de propiedades muy distintas con respecto al espectro de sustrato, valor óptimo de pH así como estabilidades frente a la temperatura y a disolventes, que frecuentemente se complementan de manera recíproca. Por tanto, enzimas
35 homólogas, incluso proporcionalmente similares pueden presentar en cuanto a un determinado sustrato un comportamiento de conversión completamente distinto. Por otro lado no están clonadas ni mucho menos todas las enzimas descritas y no pueden sobreexpresarse en medida suficiente, lo que significa que estas enzimas no están a disposición para una aplicación industrial.

Por tanto es necesario para el aprovechamiento más amplio posible del potencial sintético de la hidrogenación
40 asimétrica enzimática, disponer de una cartera lo más amplia posible de oxidorreductasas industrialmente accesibles y diferentes. Entretanto pueden definirse claramente los requerimientos de enzimas que pueden usarse industrialmente de manera ventajosa.

El objetivo de la presente invención es por tanto la identificación y la facilitación de oxidorreductasas estables, dependientes de NADH y R-específicas, que sean adecuadas para el procedimiento para la reducción de
45 compuestos cetónicos para dar alcoholes quirales usando la regeneración de coenzima acoplada a sustrato.

Para ello es necesaria la facilitación de oxidorreductasas con estabilidad lo más alta posible frente a alcoholes secundarios, en particular frente a isopropanol. Además debían caracterizarse las enzimas que van a facilitarse por una buena capacidad de expresión en *Escherichia coli* (>500 unidades/g de biomasa húmeda de *E. coli*).

Debido al alto requerimiento de estabilidad y capacidad de expresión en *E. coli* se partió en la presente invención de
50 que pueden preferirse enzimas bacterianas frente a enzimas de levadura.

El objetivo de la presente invención es además la identificación de tales secuencias de aminoácidos o secuencias génicas que representen oxidorreductasas de expresión recombinante, estables, dependientes de NADH, (R)-específicas y sean adecuadas desde el punto de vista del procedimiento técnico usando regeneración de coenzima acoplada con enzima.

55 Por la parte inventora se estableció que tales secuencias llevan en general las características conocidas de una

deshidrogenasa “de cadena corta”, como por ejemplo un plegamiento de Rossmann N-terminal GxxxGxG para la unión a cofactor, un motivo NAG en la posición 87, que se ocupa de la estabilización de la estructura de hoja plegada β central, y una triada catalítica altamente conservada que está constituida por S 139, Y 152 y K 156 en el centro activo. Para los fines de la presente solicitud se realiza la asignación numérica de restos de aminoácidos homólogos individuales en las secuencias de proteínas mediante el “algoritmo de alineación de proteínas multidireccional, *multi-way protein alignment algorithm*” con la matriz de puntuación BLOSUM62 con la secuencia de referencia 2bhd_Strex y las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:7.

En la variedad de secuencias de aminoácidos disponibles en internet que presentan esta signatura, se necesitó la definición de otras características para limitar este conjunto de secuencias. Por tanto por la parte inventora se postuló que las oxidorreductasas (R)-específicas con las propiedades descritas deben presentar adicionalmente las siguientes características de secuencia y patrones:

- un resto de aminoácido negativamente cargado en la posición 37
- dos motivos C-terminales en el dominio de dimerización: [A; S]-S-F y [V; I]-DG-[G; A]-Y-[T; C; L]-[A; T; S]-[Q; V; R; L; P]
- una signatura de R-ADH en la posición 205 a 209: H-[P; A]-[I; A; Q; V; L]-[G; K]-R
- Val o Leu en la posición 159
- Asn en la posición 178
- un resto de prolina en la posición 188.

Según este patrón se seleccionaron del conjunto de secuencias accesibles a partir de proyectos de secuenciación las siguientes secuencias sin asignación de función existente, se clonaron y se caracterizaron con respecto a su función.

Tabla 1.

SEQ ID NO	Origen	Longitud	Número de acceso	Homólogos siguientes
SEQ ID NO:1	Bacillus cereus ATCC 14579	247 aa	NP-833194	Glucosa-1-deshidrogenasa de Lysinibacillus 59 % de identidad
SEQ ID NO:2	Methylobium petroleiphilum Pml	257 aa	YP-001020081	Deshidrogenasa de cadena corta de Flavobacterium 59 % de identidad
SEQ ID NO:3	Mesorhizobium sp.	251 aa	YP-676781	Supuesta oxidorreductasa de Sinorhizobium 62 % de identidad
SEQ ID NO:4	Streptomyces coelicolor	263 aa	NP-631416	Deshidrogenasa de cadena corta de Comamonas testosteroni 57 % de identidad
SEQ ID NO:5	Ralstonia	253 aa	YP-299653 (epimerasa/deshidratasa/reductasa SDR)	Deshidrogenasa de cadena corta de Bacillus 54 % de identidad
SEQ ID NO:6	Herpetosiphon aurantiacus ATCC 23779	252 aa	YP-001544828	Deshidrogenasa de cadena corta de Comamonas testosteroni 54 % de identidad
SEQ ID NO:7	Paracoccus denitrificans	249 aa	ZP-00631061	Deshidrogenasa de cadena corta, Pedobacter 57 % de identidad

2bhd_Strex	1	-----mhdltgkn--viitggarglgaaearqavaagahvltb
Seq ID No 1	1	-----mkldkdvaiitggasgigestvrlfieegakvviad
Seq ID No 2	1	-----mgrvd-----nkvalvtggakgigrasalmllaregarvltb
Seq ID No 3	1	-----mtgefkdktvalvtggasgigaaiarelattggaeltvvd
Seq ID No 4	1	msttgttptattgyaaefagrtalvtggaasgiglatarrlgaggarvvd
Seq ID No 5	1	-----meyidmkldkdvaiitggasgigestvrlfasqgasvviad
Seq ID No 6	1	-----mnqydfrgkvalvtggasgigaacvhtfarggakvviad
Seq ID No 7	1	-----mdirfdnkialvtgagsglgenialelaasgatvvaad
2bhd_Strex	38	vldddg-enaarel---gdrarflhhvdtseedwsraadfavtefgahg
Seq ID No 1	37	fser--gkelsdelnahgyntlfiktavtkeadikqlihetvstyglidi
Seq ID No 2	38	veeaqgsa-vakeieraggkalfltqdvtdesrwvevekaragvggini
Seq ID No 3	39	lere-sanrivegirasqgrahafavdvadaeavermvdfavrtcgdhl
Seq ID No 4	51	fnae-gaekaaaelraggveaaaveldvtrpesveaavgfavdtfgsdl
Seq ID No 5	42	rsal--geklarelseesslaahysevdsreddtrrliddtvsrforidi
Seq ID No 6	40	rnqdlgaqtvaa-vreaggdailfpvdvaqsgaveamvtdtitafqgidi
Seq ID No 7	39	lhea-taratadrivaaggkakavagdvdpdavrkaeva--kgllggchl
2bhd_Strex	84	lvnnagis-tgtplesevdhfrkuldvnlitgvfigmktvvp--ikeagg
Seq ID No 1	85	myanagvad-dapanelsyekwkrtdidnlsqvlfsdkysieqfkkqtd
Seq ID No 2	87	vvnmagig-tagsaedtleawrrlmsvnlidgvlgtkhalram-kngpg
Seq ID No 3	88	avnnagigppsegtadypldgwrkvidvnlngvfymkveiaailksq-q
Seq ID No 4	100	avnnagigppsaatgeydvaayqrvvrtndgvfysmryelpaieaagkg
Seq ID No 5	90	mvnagiahpsaavedvsveqgqmidvnlitgvflsnklaivqmkkqtd
Seq ID No 6	89	avnnagiggeanptgtysiegwtvidvnlngvfycmryelpamlaag-q
Seq ID No 7	87	lvnnagigppsaavgdypldgwkvidvnlnavfygmrygipamidaag-q
2bhd_Strex	132	-gsivnissaaqlmgilaltagygeskwvrgltkigavewgta--rvvva
Seq ID No 1	134	-gvivnagsahsfvslptptayssakggvklitqnlctayakvg--lrin
Seq ID No 2	135	tgslihisaeqdivadpklasyndskggvrfksaalhcaagayriva
Seq ID No 3	137	-galvnmasilqsvqfanacayvsakhallgitktaameyaagq--vvin
Seq ID No 4	150	-gsivnvasilqsvqfagspayvaakhgvvgltkaaaeyaarg--lrin
Seq ID No 5	140	-galvnmasilqhvmpgaasyaakggvvnitrlslgvshaqdg--lrin
Seq ID No 6	138	-gvivnmasilqsvqfasspayvaakhaevgtltkaaaldivgrqg--lrin
Seq ID No 7	136	-galvnmasilqsvqfngagayvsakhavvgmtknaaleyaqkg--lrin
2bhd_Strex	179	svhpqntytpntaavgiergegekypnt-----pmgrvgeadelaagarvi
Seq ID No 1	181	avcpqyidpallgsv-n-----pqqkeylaslhpqgqlgtpeevakavlf
Seq ID No 2	185	tihqgyiwpmvegytlslgdveggrqvismkbpigmgpepddiaygyly
Seq ID No 3	184	avgpafidpallsknld-----dqvlqqlaglnpignlgtpeevsalcif
Seq ID No 4	197	avgpqfidpall-ktmd-----eaaykgilvalhpagqlerseevaeliaf
Seq ID No 5	187	avcpqfvatpliera-t-----eeararlvaahpignlghadevakavlf
Seq ID No 6	185	svgpqfikpalldgld-----dqtqtyisglhavomgesaevaavaf
Seq ID No 7	183	svgpafidpalldqld-----sdtrqalvgrnpignlghadevaglvvi
2bhd_Strex	223	ilsdaasyvtgaelaydgawttdgptvayvmgq
Seq ID No 1	225	lasdcasfvngtllvdggytar-----
Seq ID No 2	235	lgsdassmtgselvidggytaq-----
Seq ID No 3	229	ilsgrasfittgshlvdggyttr-----
Seq ID No 4	241	ilsdrasfvagsyhlvdgaytav-----
Seq ID No 5	231	lasdcasfvvgtslmdvggycaq-----
Seq ID No 6	230	lcsaasfittggyylvdggytaq-----
Seq ID No 7	227	ilsdrasfittgshlvdggytal-----

Comparación de secuencias de aminoácidos multidireccional de proteínas seleccionadas. Matriz de puntuación BLOSUM 62. Representados de manera sombreada restos de aminoácidos idénticos específicos de posición, comparados con la secuencia de referencia 2bhd_Strex.

Están encuadrados los motivos de secuencia reivindicados por la parte inventora.

Sorprendentemente pudo mostrarse para todas las siete secuencias que se trata de R-ADH dependientes de NADH que disponen de suficiente estabilidad, en particular frente a 2-propanol. Además pudo mostrarse para todas las siete enzimas que son adecuadas para procedimientos de reducción enzimáticos con regeneración de coenzima acoplada con cosustrato.

- 5 Esto es un resultado sorprendente e inesperado, en particular dado que las secuencias presentan entre sí un grado de homología sumamente bajo (tabla 2) y también en caso de comparación de secuencias (Pubmed/Blast) no pudieron identificarse secuencias relacionadas que hubieran proporcionado una indicación de función en esta dirección (tabla 1). Por otro lado pudo mostrarse además que las enzimas en cuestión se diferencian de manera suficiente en sus propiedades enzimáticas y se complementan en cuanto a su utilidad para el procedimiento, en particular en dianas especiales.
- 10 El uso de las oxidoreductasas mencionadas en el procedimiento de acuerdo con la invención no representa por tanto ninguna alternativa equivalente al estado de la técnica existente, sino una ampliación del espectro existente.

Tabla 2. Comparación por parejas de secuencias de aminoácidos de oxidorreductasas seleccionadas

SEQ ID NO	Organismo	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7
SEQ ID NO:1	Bacillus cereus ATCC 14579	100	37 / 5	41 / 2	40 / 6	54 / 2	41 / 3	38 / 2
SEQ ID NO:2	Methylibium petroleiphilum Pml	37 / 5	100	37 / 6	33 / 8	41 / 5	39 / 4	43 / 4
SEQ ID NO:3	Mesorhizobium sp.	41 / 2	37 / 6	100	56 / 6	41 / 2	56 / 0	64 / 0
SEQ ID NO:4	Streptomyces coelicolor	40 / 6	33 / 8	56 / 6	100	43 / 3	53 / 5	54 / 5
SEQ ID NO:5	Ralstonia	54 / 2	41 / 5	41 / 2	43 / 3	100	45 / 1	46 / 4
SEQ ID NO:6	Herpentosiphon aurantiacus	41 / 3	39 / 4	56 / 0	53 / 5	45 / 1	100	53 / 1
SEQ ID NO:7	Paracoccus denitrificans	38 / 2	43 / 4	64 / 0	54 / 5	46 / 4	53 / 1	100

El grado de homología en la tabla 2 está indicado como porcentaje de restos de aminoácidos idénticos y número de desplazamientos en un alineamiento por parejas óptimo. El alineamiento óptimo se determina a este respecto con ayuda del algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 2264-2268). Como matriz de puntuación para el cálculo de la semejanza de secuencias se toma como base la matriz PAM30 (Dayhoff, M.O., Schwarz, R.M., Orcutt, B.C. 1978. "A model of evolutionary change in Proteins" en "Atlas of Protein Sequence and structure" 5(3) M. O. Dayhoff (ed) 345-352, National Biomedical Research foundation).

La invención se plantea el objetivo de proporcionar un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de compuestos cetónicos para dar los correspondientes compuestos de hidroxilo quirales, que cubra un amplio espectro de sustratos y en condiciones de procedimiento técnico proporcione altas conversiones.

Este objetivo se soluciona de acuerdo con la invención mediante un procedimiento del tipo mencionado anteriormente que está caracterizado porque para la reducción de los compuestos cetónicos se usa un polipéptido que presenta una signatura de R-ADH H-[P; A]-[I; A; Q; V; L]-[G; K]-R en la posición 205-209 y las siguientes características estructurales adicionales en su totalidad:

- (i) un plegamiento de Rossmann N-terminal GxxxGxG
- (ii) un motivo NAG en la posición 87,
- (iii) una triada catalítica que está constituida por S 139, Y 152 y K 156,
- (iv) un resto de aminoácido negativamente cargado en la posición 37,
- (v) dos motivos C-terminales en el dominio de dimerización [A; S]-S-F y [V; I]-DG-[G; A]-Y-[T; C; L]-[A; T; S]-[Q; V; R; L; P],
- (vi) Val o Leu en la posición 159,
- (vii) Asn en la posición 178, y
- (viii) un resto de prolina en la posición 188.

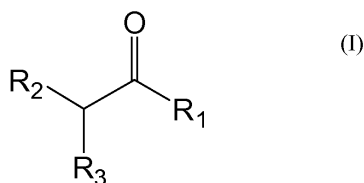
De acuerdo con una forma de realización preferente del procedimiento de acuerdo con la invención se usa para la reducción de los compuestos cetónicos un polipéptido,

- (a) que presenta una de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:7 o
- (b) en el que al menos el 70 % de los aminoácidos son idénticos con los aminoácidos de una de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:7 o
- (c) al que codifica una secuencia de ácido nucleico del grupo que está constituido por SEQ ID NO: 8 a SEQ ID NO: 14 o
- (d) al que codifica una secuencia de ácido nucleico que hibrida con una de las secuencias de ácido nucleico mencionadas en (c) en condiciones rigurosas.

Por una secuencia de ácido nucleico, que hibrida por ejemplo con la SEQ ID NO: 14 en condiciones rigurosas, se entiende un polinucleótido, que puede identificarse por medio del procedimiento de hibridación de colonia, del procedimiento de hibridación de placa, del procedimiento de hibridación Southern o similares usando la SEQ ID NO:14 o secuencias parciales de SEQ ID NO: 14 como sonda de ADN. Para este fin se hibrida el polinucleótido inmovilizado en un filtro por ejemplo con la SEQ ID NO: 14 en una solución 0,7-1 M de NaCl a 65 °C. La hibridación se realiza tal como se describe por ejemplo en el protocolo 32 de Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) o publicaciones similares. A continuación se lava el filtro con solución de SSC de 0,1 a 2 veces a 65 °C, entendiéndose por solución de SSC de 1 vez una mezcla que está compuesta de NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM.

Un polinucleótido que hibrida con el polinucleótido SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14 en condiciones rigurosas mencionadas anteriormente, debía presentar al menos un 68 % de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótido SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14, mejor al menos un 80 % de identidad, aún mejor un 95 % de identidad.

De acuerdo con otra forma de realización preferente se usan compuestos cetónicos de fórmula general I,

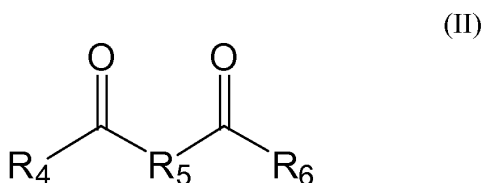


en la que R_1 , R_2 y R_3 independientemente se seleccionan del grupo, que está constituido por

- 1) -H, con la condición de que R_1 no sea H,
- 2) alquilo (C_1-C_{20}), en el que alquilo es de cadena lineal o de cadena ramificada,
- 3) alqueno (C_2-C_{20}), en el que alqueno es de cadena lineal o de cadena ramificada y contiene eventualmente hasta cuatro dobles enlaces,
- 4) alquino (C_2-C_{20}), en el que alquino es de cadena lineal o de cadena ramificada y contiene eventualmente hasta cuatro triples enlaces,
- 5) arilo (C_6-C_{24}),
- 6) alquil (C_1-C_8)-arilo (C_6-C_{14}),
- 7) heterociclo (C_5-C_{14}),
- 8) cicloalquilo (C_3-C_7),

en el que los restos mencionados anteriormente en 2) a 8) están no sustituidos o independientemente entre sí están mono-, di- o tri-sustituidos con -OH, halógeno, -NO₂, -NH₂, -NHP y/o -M, en el que P representa alquilo (C_1-C_7), alqueno (C_2-C_7), alquino (C_2-C_7), arilo (C_6-C_{14}) o un grupo protector, seleccionado de benciloxycarbonilo, trifenilmetilo y t-butilcarbonilo, y M representa alquilo (C_1-C_7), alqueno (C_2-C_7), alquino (C_2-C_7), arilo (C_6-C_{14}), o alquil (C_1-C_8)-arilo (C_6-C_{14}), en el que arilo (C_6-C_{14}) en alquil (C_1-C_8)-arilo (C_6-C_{14}) está no sustituido o está mono-, di- o tri-sustituido con halógeno, y 9) -CH₂-X-R, en el que X representa O o S y R se selecciona de alquilo (C_1-C_7), fenilo y bencilo, en el que fenilo y bencilo están mono-, di- o tri-sustituido con alquilo (C_1-C_7), -S-alquilo (C_1-C_3), -O-alquilo (C_1-C_3), -NO₂, -SCF₃, halógeno, -C(O)-alquilo (C_1-C_3) y/o -CN, o R_1 con R_2 , R_1 con R_3 o R_2 con R_3 forma un anillo con 3-6 átomos de C, que está no sustituido o independientemente entre sí está mono-, di- o tri-sustituido con -OH, halógeno, -NO₂, -NH₂, -NHP y/o -M, y el otro resto se selecciona de los restos mencionados anteriormente en 1) a 9).

De acuerdo con otra forma de realización preferente se usan dicetonas de fórmula general II



en la que

- R_5 representa (CH₂)_n con $n = 0 - 20$, arilo (C_6-C_{14}) o -heterociclo (C_5-C_{14}),
 R_4 y R_6 independientemente entre sí representan alquilo (C_1-C_{20}) o un grupo éster,
 en la que R_4 , R_5 y R_6 están no sustituidos o independientemente entre sí están mono-, di- o tri-sustituido con alquilo (C_1-C_4), -OH, halógeno, -NO₂ y/o -NH₂.

En el procedimiento de acuerdo con la invención se prefiere además que

- el cofactor NAD oxidado formado mediante la oxidorreductasa/deshidrogenasa se regenera continuamente y
- para la regeneración del cofactor se usa un alcohol secundario con la fórmula general R_xR_yCHOH , en la que R_x y R_y independientemente entre sí es un grupo alquilo C_1-C_8 ramificado o no ramificado y $C_{en\ total} \geq 3$.

El término "NAD" significa nicotinamida-adenin-dinucleótido, el término "NADH" representa nicotinamida-adenin-dinucleótido reducido.

Los alcoholes secundarios (= cosustratos) se convierten con ayuda de las oxidorreductasas usadas y NAD en las correspondientes cetonas y NADH, produciéndose la regeneración del NADH. La proporción del cosustrato para la regeneración asciende a este respecto a del 5 % al 95 % en volumen, con respecto al volumen total, preferentemente del 10-70 %, de manera especialmente preferente del 20-50 %.

De manera especialmente preferente se usa como alcohol secundario 2-propanol o 2-butanol para la regeneración del cofactor. En el caso de 2-propanol se usa preferentemente del 10-70 % (v/v), de manera especialmente preferente del 20-50 % (v/v).

Por el término “arilo” se entiende restos de hidrocarburo aromáticos con 6 a 24 átomos de carbono en el anillo / en los anillos (condensados y conjugados). Los restos arilo (C_6-C_{24}) son por ejemplo fenilo, naftilo, por ejemplo 1-naftilo, 2-naftilo, bifenililo, por ejemplo 2-bifenililo, 3-bifenililo y 4-bifenililo, antracilo, fluorenilo, fenantrilo o ciclopentanoperhidrofenantrilo. Los restos bifenililo, restos naftilo y en particular restos fenilo son restos arilo preferentes.

Por el término “halógeno” se entiende un elemento de la serie flúor, cloro, bromo o yodo.

Por el término “alquilo (C_1-C_{20})” se entiende un resto de hidrocarburo, cuya cadena de carbono es lineal o ramificada y contiene de 1 a 20 átomos de carbono por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decanilo etc.

Por el término “cicloalquilo (C_3-C_7)” se entiende restos de hidrocarburo cíclicos tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo.

El término “heterociclo (C_5-C_{14})” representa un anillo heterocíclico de 5 miembros a 14 miembros monocíclico o bicíclico, que está parcialmente saturado o completamente saturado. Ejemplos de heteroátomos son N, O y S. Ejemplos de los términos heterociclo (C_5-C_{14}) son restos que se derivan de pirrol, furano, tiofeno, imidazol, pirazol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, tetrazol, 2-óxido de 1,2,3,5-oxatiazol, triazolona, oxadiazolona, isoxazolona, oxadiazolidindiona, triazol, que están sustituidos con F, -CN, $-CF_3$ o $-C(O)-O$ -alquilo (C_1-C_4), 3-hidroxipirro-2,4-diona, 5-oxo-1,2,4-tiazol, piridina, pirazina, pirimidina, indol, isoindol, indazol, ftalazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, quinazolina, cinnolina, carbolina y derivados benzocondensados, derivados ciclopentacondensados, ciclohexacondensados o cicloheptacondensados de estos heterociclos. En particular se prefieren los restos 2- o 3-pirrolilo, fenilpirrolilo tal como 4- o 5-fenil-2-pirrolilo, 2-furilo, 2-tienilo, 4-imidazolilo, metil-imidazolilo, por ejemplo 1-metil-2-, -4- o -5-imidazolilo, 1,3-tiazol-2-ilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, N-óxido de 2-, 3- o 4-piridilo, 2-pirazinilo, 2-, 4- o 5-pirimidinilo, 2-, 3- o 5-indolilo, 2-indolilo sustituido, por ejemplo 1-metil-, 5-metil-, 5-metoxi-, 5-benciloxi-, 5-cloro- o 4,5-dimetil-2-indolilo, 1-bencil-2- o -3-indolilo, 4,5,6,7-tetrahidro-2-indolilo, ciclohepta[b]-5-pirrolilo, 2-, 3- o 4-quinolilo, 1-, 3- o 4-isoquinolilo, 1-oxo-1,2-dihidro-3-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 2-benzofuranilo, 2-benzotienilo, 2-benzoxazolilo o benzotiazolilo o dihidropiridinilo, pirrolidinilo, por ejemplo 2- o 3-(N-metilpirrolidinilo), piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tetrahidrotienilo o benzodioxolanilo.

Los compuestos preferentes de fórmula I son por ejemplo 4-cloroacetoacetato de etilo, acetoacetato de metilo, ácido etil-8-cloro-6-oxooctanoico, 3-oxovaleriato de etilo, 4-hidroxi-2-butanona, 2-oxovaleriato de etilo, ácido etil-2-oxo-4-fenilbutírico, piruvato de etilo, fenilglioxilato de etilo, 1-fenil-2-propanona, 2-cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ona, acetofenona, 2-octanona, 3-octanona, 2-butanona, 1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etan-1-ona, 1,4-dicloro-2-butanona, acetoxiacetona, cloruro de fenacilo, 4-bromoacetoacetato de etilo, 1,1-dicloroacetona, 1,1,3-tricloroacetona o 1-cloroacetona.

Los compuestos especialmente preferentes son compuestos aromáticos o heteroaromáticos de fórmula general $R-CO-CH_2-X$, en la que representa X = halógeno y R un resto de acuerdo con la definición anterior de la fórmula I.

Otros compuestos preferentes son dicetonas tales como 2,5-hexanodiona, 2,4-pentanodiona, 2,7-octanodiona, 2,7-dimetil-3,6-octanodiona o diacetilo.

Las oxidorreductasas pueden usarse en el procedimiento de acuerdo con la invención o bien de manera completamente purificada o de manera parcialmente purificada o el procedimiento puede realizarse con células que contienen las oxidorreductasas descritas. Las células usadas pueden encontrarse a este respecto de manera nativa, permeabilizada o lisada. Preferentemente se usan las oxidorreductasas clonadas de acuerdo con la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 o sus homólogos.

Por cada kg de compuesto cetónico que va a reaccionar se usan de 5000 a 10 millones de U de oxidorreductasa. (abierto hacia arriba) La unidad enzimática 1 U corresponde a este respecto a la cantidad de enzima que se requiere para hacer reaccionar 1 μ mol del compuesto cetónico por minuto (min).

El compuesto cetónico se usa en el procedimiento de acuerdo con la invención en una cantidad del 3 % al 50 %, con respecto al volumen total, preferentemente del 5 % al 40 %, en particular del 10 % - 30 %.

El TTN (*total turn over number* = mol de compuesto cetónico reducido / mol de cofactor usado) conseguido en el procedimiento de acuerdo con la invención se encuentra por regla general en el intervalo de 10^2 a 10^5 , preferentemente éste asciende sin embargo a $\geq 10^3$.

Para la regeneración del cofactor puede añadirse adicionalmente una alcoholdehidrogenasa, sin embargo preferentemente se realiza el procedimiento solo con una oxidorreductasa (regeneración de coenzima acoplada a sustrato).

La parte acuosa de la mezcla de reacción, en la que se desarrolla la reducción enzimática, contiene preferentemente un tampón, por ejemplo tampón fosfato de potasio, Tris/HCl o trietanolamina, con un valor de pH de 5 a 10, preferentemente un valor de pH de 6 a 9. El tampón puede contener adicionalmente aún iones para la estabilización o activación de las enzimas, por ejemplo iones zinc o iones magnesio.

La temperatura asciende durante la realización del procedimiento de acuerdo con la invención convenientemente a de aproximadamente 10 °C a 70 °C, preferentemente de 20 °C a 45 °C.

En otra forma de realización posible del procedimiento de acuerdo con la invención se realiza la reacción enzimática en presencia de disolventes orgánicos no miscibles con agua o miscibles con agua solo de manera limitada, que no participan en la regeneración del cofactor, es decir no contienen grupos hidroxilo que pueden oxidarse. Este disolvente puede ser por ejemplo un dialquil(C₁-C₆)éter simétrico o asimétrico, un alcano de cadena lineal o ramificado o cicloalcano. Preferentemente se usan como disolventes orgánicos adicionales dietiléter, terc-butilmetiléter, diisopropiléter, dibutiléter, acetato de etilo, acetato de butilo, heptano, hexano, tolueno, diclorometano, ciclohexano o mezclas de los mismos.

La concentración del cofactor NAD(H) en la fase acuosa asciende generalmente a de 0,001 mM a 1 mM, en particular de 0,01 mM a 0,1 mM.

En el procedimiento de acuerdo con la invención puede usarse aún un estabilizador de la oxidoreductasa/deshidrogenasa. Los estabilizadores adecuados son por ejemplo glicerina, sorbitol, 1,4-DL-ditiotreitól (DTT) o dimetilsulfóxido (DMSO).

La propia reducción enzimática se desarrolla en condiciones suaves, de modo que los alcoholes generados no reaccionan posteriormente. El procedimiento de acuerdo con la invención presenta un alto tiempo de exposición, una pureza de enantiómeros por regla general superior al 95 % de los alcoholes quirales preparados y un alto rendimiento con respecto a la cantidad usada de compuestos cetónicos.

El procedimiento de acuerdo con la invención se realiza por ejemplo en un recipiente de reacción cerrado de vidrio o metal. Para ello se transfieren los componentes individualmente al recipiente de reacción y se agitan bajo una atmósfera de por ejemplo nitrógeno o aire. El tiempo de reacción asciende a de 1 hora a 48 horas, en particular de 2 horas a 24 horas.

A continuación se procesa la mezcla de reacción. Para ello se separa la fase acuosa, se filtra la fase orgánica. La fase acuosa puede extraerse eventualmente otra vez y como la fase orgánica puede procesarse posteriormente. Después se evapora eventualmente el disolvente de la fase orgánica filtrada.

Mediante los siguientes ejemplos se explica en más detalle la invención y se demuestra la particularidad de las oxidoreductasas identificadas con respecto al estado de la técnica.

Ejemplo 1: clonación y expresión de la oxidoreductasa SEQ ID NO:5

A) Cultivo de *Ralstonia eutropha* JMP134

Se cultivaron células de *Ralstonia eutropha* DSM 4048 en el siguiente medio (pH 7,0) a 30 °C en una incubadora de bacterias: 0,5 % de peptona, 0,3 % de extracto de carne. En el día 3 del cultivo se separaron las células por medio de centrifugación del medio de cultivo y se almacenaron a -80 °C.

B) Amplificación del gen que codifica oxidoreductasa selectiva

Se extrajo ADN genómico según el procedimiento descrito en "Molecular Cloning" de Manniatis & Sambrook (véase anteriormente). El ácido nucleico resultante sirvió como matriz para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos, que se derivaron de la secuencia génica publicada en el banco de datos NCBI con el número 53760931. A este respecto, para una clonación posterior en un vector de expresión se dotaron los cebadores en el extremo 5'-terminal de sitios de corte de restricción para las endonucleasas Nde I y Xho I.

La amplificación se realizó en un tampón de PCR [Tris-HCl 10 mM, (pH 8,0); KCl 50 mM; MgSO₄ 10 mM; mezcla de dNTP 1 mM; por 20 pmol de cebador y 2,5 U de ADN-polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen)] con 500 ng de ADN genómico y los siguientes ciclos de temperatura:

ciclo 1:	94 °C, 2 min
ciclo 2 x 30:	94 °C, 30 s
	55 °C, 30 s
	68 °C, 60 s
ciclo 3:	68 °C, 7 min
	4 °C, ∞

El producto de PCR resultante en un tamaño de aproximadamente 750 pb se restringió tras la purificación a través de un gel de agarosa al 1 % con ayuda de endonucleasas *Nde* I y *Xho* I y se ligó en el segmento principal del vector pET21a (Novagen) tratado con las mismas endonucleasas. Tras la transformación de 2 µl de la mezcla de ligación en células *E.coli* Top10 F' (Invitrogen) se sometieron a prueba los ADN de plásmido de colonias resistentes a ampicilina por medio de un análisis de restricción con las endonucleasas *Nde* I y *Xho* I para determinar la presencia de un inserto de 750 pb de tamaño. Las preparaciones de plásmido de los clones positivos para el fragmento se sometieron a un análisis secuencial y se transformaron a continuación en *Escherichia coli* BL21 Star (Invitrogen).

Ejemplo 2: expresión de las oxidorreductasas recombinantes en *E.coli*

Las cepas de *Escherichia coli*, transformadas con el constructo de expresión, BL21 Star (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), o RB791 (*E.coli* genetic stock, Yale, EE.UU.) se cultivaron en 200 ml de medio LB (1 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 1 % de NaCl) con ampicilina (50 µg / ml), o carbenicilina (50 µg / ml), hasta que se consiguió una densidad óptica, medida en 550 nm, de 0,5. La expresión de proteína recombinante se indujo mediante adición de isopropiltiogalactósido (IPTG) en una concentración de 0,1 mM. Tras inducción de 8 o 16 horas a 25 °C y 220 rpm se recogieron las células y se congelaron a -20 °C. Para el ensayo de actividad se mezclaron 10 mg de células con 500 µl de tampón TEA 100 mM pH 7,0 y 500 µl de perlas de vidrio y se solubilizaron durante 10 min por medio de un molino de bolas. El lisado obtenido se usó entonces diluido para las correspondientes mediciones. El ensayo de actividad se componía tal como sigue: 870 µl de tampón TEA 100 mM pH 7,0, 160 µg de NAD(P)H, 10 µl de lisado celular diluido. La reacción se inició mediante adición de 100 µl de una solución de sustrato 100 mM a la mezcla de reacción.

Las oxidorreductasas de la presente invención podían expresarse de manera muy eficaz en *Escherichia coli*. La tabla 3 muestra las actividades conseguidas en la expresión de las enzimas individuales.

Tabla 3

	Vector de expresión	Cepa de expresión	Referencia	Actividad U/g
SEQ ID NO:1	pET21a	BL21 Star	2-octanona	2650 U/g
SEQ ID NO:2	pET21a	BL21 Star	acetoacetato de metilo	1570 U/g
SEQ ID NO:3	pQE70	BL21 Star	CLAE	3130 U/g
SEQ ID NO:4	pET21a	BL21 Star	2-oxo-4-fenilbutanoato de etilo	400 U/g
SEQ ID NO:5	pET21a	BL21 Star	CLAE	2890 U/g
SEQ ID NO:6	pQE70	BL21 Star	acetoacetato de metilo	840 U/g
SEQ ID NO:7	pET21a	BL21 Star	acetoacetato de metilo	3295 U/g

Ejemplo 3: caracterización de las oxidorreductasas recombinantes SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO: 7**3a: grado óptimo de pH**

Se prepararon los tampones mencionados en la tabla 4. La concentración de los respectivos componentes de tampón ascendía respectivamente a 50 mM.

Tabla 4

Valor de pH	Sistema tampón	Valor de pH	Sistema tampón
4	acetato de Na/ácido acético	7,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄
4,5	acetato de Na/ácido acético	8	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄
5	acetato de Na/ácido acético	8,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄
5,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	9	Glicina/NaOH
6	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	9,5	Glicina/NaOH
6,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	10	Glicina/NaOH
7	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	11	Glicina/NaOH

Reducción del grado de óptimo de pH de la mezcla de reacción de medición (30 °C):

870 µl de los sistemas tampón mencionados respectivamente en la tabla 3
 20 µl NADH 10 mM
 10 µl enzima diluida

Tras incubación de aproximadamente 2 a 3 min se realizó la adición de

100 µl de disolución de sustrato (100 mM)

- 5 Como sustrato se usó para cada oxidoreductasa el respectivo sustrato de referencia (tabla 3). La reacción se siguió durante 1 min a 340 nm. Para la determinación del grado óptimo de pH se determinó la reacción enzimática en el respectivo tampón mencionado en la tabla 4. Para la determinación del grado óptimo de pH para la reacción de oxidación se usó como cofactor NAD y como sustrato 2-propanol o 2-octanol.

En la tabla 5 están agrupados los resultados para las oxidoreductasas SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:7.

Tabla 5:

SEQ ID NO	Red. de valor opt. de pH	Ox. de valor opt. de pH
SEQ ID NO:1	5,5-6,5	9,0-9,5
SEQ ID NO:2	5.0-5,5	9-10
SEQ ID NO:3	5,5	10-11
SEQ ID NO:4	5,5	9-10
SEQ ID NO:5	7,0 -7,5	9,5-10
SEQ ID NO:6	5,5-6,5	7,5
SEQ ID NO:7	5,5	10-11

10 3b: estabilidad frente a pH

- La estabilidad de las oxidoreductasas recombinantes se sometió a estudio mediante almacenamiento en los sistemas tampón mencionados en la tabla 4. Para ello se fijaron los distintos tampones (50 mM) en el intervalo de pH de 4 a 11 y las oxidoreductasas preparadas de acuerdo con el ejemplo 4 se diluyeron con esto. Tras incubación durante 30, 60 y 120 min se extrajeron de la mezcla de reacción 10 µl y se usaron en la prueba de la actividad de acuerdo con el ejemplo 3a.

- 15 El valor de partida era a este respecto el valor de medición, que se obtuvo directamente tras la dilución (1:20) de la enzima en tampón fosfato de potasio 50 mM pH = 7,0. Este valor correspondía en las condiciones predeterminadas a una modificación de la extinción de aproximadamente 0,70 /min y se estableció como el valor del 100 %. Todos los valores de medición siguientes se relacionaron con este valor.

- 20 En la tabla 6 están agrupados los intervalos de pH para las oxidoreductasas mencionadas, en los que las enzimas presentaban con incubación de 120 min no menos del 50 % de la actividad de partida.

Tabla 6:

SEQ ID NO	Intervalo de pH de estabilidad
SEQ ID NO:1	4,5-9,5
SEQ ID NO:2	7.0-10
SEQ ID NO:3	5,5-11
SEQ ID NO:4	5,5-9,5
SEQ ID NO:5	7,5-11
SEQ ID NO:6	6-11
SEQ ID NO:7	5-11

3c: grado óptimo de temperatura

Para la determinación de la temperatura de prueba óptima se midió la actividad enzimática para las oxidorreductasas usadas de acuerdo con la invención en el intervalo de temperatura de 15 °C a 70 °C en la mezcla de reacción de medición patrón.

- 5 Los grados óptimos de temperatura determinados están resumidos en la tabla 7:

Tabla 7

SEQ ID NO	Valor opt. de temperatura
SEQ ID NO:1	55 °C
SEQ ID NO:2	65 °C
SEQ ID NO:3	n.d
SEQ ID NO:4	n.d
SEQ ID NO:5	45 °C
SEQ ID NO:6	50 °C
SEQ ID NO:7	45 °C

3d: estabilidad frente a la temperatura

- 10 De manera análoga tal como se ha descrito en el ejemplo 3c se determinó la estabilidad frente a la temperatura para el intervalo de 15 °C a 70 °C. Para ello se incubó respectivamente una dilución de las oxidorreductasas usadas de acuerdo con la invención durante 60 min y 180 min a la respectiva temperatura y a continuación a 30 °C se midió con la mezcla de reacción de prueba anterior. En la tabla 8 están agrupados los intervalos de temperatura para las oxidorreductasas, en los que las enzimas presentaban con incubación de 120 min no menos del 50 % de la actividad de partida.

- 15 Tabla 8

SEQ ID NO	Intervalo de temperatura
SEQ ID NO:1	15-45 °C
SEQ ID NO:2	15-35 °C
SEQ ID NO:3	n.d
SEQ ID NO:4	n.d
SEQ ID NO:5	15-35 °C
SEQ ID NO:6	15-35 °C
SEQ ID NO:7	15-45 °C

3e: estabilidad frente a 2-propanol

- 20 La estabilidad de las oxidorreductasas que van a someterse a estudio frente a 2-propanol se sometió a estudio diluyendo los lisados obtenidos en el ejemplo 2 (de expresión recombinante) en tampón (KPP 100 mM, pH=7,0), que contenía la parte porcentual correspondiente de 2-propanol (aprox. 10 unidades/ml de tampón). la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente con mezclado constante (termomezclador con 170 rpm). Tras incubación durante 24 h se extrajeron respectivamente de la fase acuosa 10 µl y se usaron para la determinación de la actividad enzimática en la mezcla de reacción de prueba patrón (tampón fosfato de potasio (KPP) 100 mM, pH = 7,0, NADH 0,2 mM, sustrato 10 mM). También en este caso se fijó el valor de partida directamente tras dilución en el tampón
- 25 igual al 100 % y todos los otros valores se relacionaron con éste.

Tabla 9: actividad enzimática tras incubación durante 24 h con mezclas que contienen 2-propanol

SEQ ID NO	Tampón	10 % de 2-propanol	20 % de 2-propanol	30 % de 2-propanol	40 % de 2-propanol
SEQ ID NO:1	100 %	100 %	100 %	100 %	30 %
SEQ ID NO:2	100 %	100 %	100 %	100 %	30 %
SEQ ID NO:3	100 %	80-100 %	50-75 %	25-30 %	0 %
SEQ ID NO:4	100 %	80-100 %	50-75 %	0 %	0 %
SEQ ID NO:5	100 %	100 %	100 %	100 %	0 %
SEQ ID NO:6	100 %	80-100 %	50-75 %	50-75 %	50-75 %
SEQ ID NO:7	100 %	80-100 %	50-75 %	25-30 %	25-30 %

Tal como es evidente a partir de la tabla 9, presentan todas las secuencias sometidas a estudio una sorprendente estabilidad en 2-propanol, es decir todas las oxidoreductasas son estables en isopropanol al 20 % al menos durante 24 h, sin embargo la mayor parte de las enzimas muestran incluso tras 24 h con un 40 % (v/v) reactividades aún considerables de hasta el 75 %. Esto muestra que son adecuadas las secuencias SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:7 en particular para la aplicación en el procedimiento acoplado a sustrato con 2-propanol.

3f: comparación de los espectros de sustrato de las oxidoreductasas SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 7

El espectro de sustrato de las secuencias que van a caracterizarse se determinó mediante medición de la actividad enzimática para la reducción y oxidación con una serie de cetonas y alcoholes. Para ello se usó la mezcla de reacción de medición patrón de acuerdo con el ejemplo 2 con distintos sustratos.

La actividad con acetoacetato de metilo se fijó para todas las enzimas igual al 100 % y todos los otros sustratos se relacionaron con esto.

Tabla 10: espectros de sustrato / reducción

Sustrato	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7
1-fenil-2-propanona	15 %	7 %	70 %	37 %	<1 %	<1 %	16 %
cloruro de fenacilo	3,4 %	1 %	50 %	<1 %	<1 %	15 %	10 %
acetofenona	3,5 %	6 %	30 %	<1 %	<1 %	3,5 %	32 %
acetonaftona	3 %	9 %	30 %	7 %	<1 %	25 %	17 %
butirofenona	3 %	1 %	< %	<1 %	<1 %	<1 %	<1 %
2-octanona	92 %	2 %	33 %	70 %	26 %	23 %	49 %
3-octanona	22 %	2 %	15 %	5 %	13 %	2 %	15 %
2-butanona	8,5 %	4,5 %	30 %	5 %	<1 %	7 %	6 %
2-oxovaleriato de etilo	3 %	60 %	70 %	17 %	<1 %	15 %	<1 %
ácido etil-2-oxo-4-fenilbutírico	3 %	50 %	118 %	35 %	45 %	18 %	10 %

(continuación)

Sustrato	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7
piruvato de etilo	140 %	70 %	100 %	64 %	13 %	116 %	160 %
fenilglioxilato de etilo	4,8 %	53 %	7,5 %	3 %	<1 %	<1 %	<1 %
4-cloroacetoacetato de etilo	12,5 %	20 %	21 %	100 %	50 %	10 %	<1 %
acetoacetato de metilo	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
3-oxovaleriato de etilo	3,5 %	30 %	76 %	11 %	<1 %	10 %	12 %
acetona	4,5 %	16 %	38 %	5 %	<1 %	3,5 %	8 %

Para los sustratos seleccionados se determinaron los excesos enantioméricos. Para ello se usó la siguiente mezcla de reacción:

- 5 • 160 µl de tampón
- 100 µl de NAD (0,4 mg/ml)
- 20-50 µl de 2-propanol
- 50 µl de solución enzimática
- 2 mg de sustrato
- 10 • condiciones de reacción: 28 °C, 24 h

Tras finalizar el tiempo de incubación se extrajeron las muestras con disolventes dependiendo del sustrato y se centrifugaron. Una alícuota se extrajo, eventualmente se separó completamente el agente de extracción, la muestra se disolvió a continuación en un disolvente adecuado y el exceso enantiomérico se determinó por medio de CG.

Tabla 11: enantioselectividad para sustratos seleccionados

Sustrato	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7
Cloruro de fenacilo	≥99,9 % de S	≥99,9 % de S	≥99,9 % de S	97,5 % de S	60-80 % de S	≥99,9 % de S	≥99,9 % de S
acetofenona	99,0 % de R	98,5 % de R	99,0 % de R			99,0 % de R	98,5 % de R
2-pentanona	≥99,9 % de R	98 % de R	98 % de R	95 % de R	99,0 % de R	97 % de R	99,5 % de R
2-octanona	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R
2-butanona	≥96,0 % de R	n.d	n.d	n.d	n.d	rac	50 % de R
piruvato de etilo	98,0 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R
4-cloroacetoacetato de etilo	99,0 % de S	≥99,9 % de S	≥99,9 % de S	≥99,9 % de S	≥99,9 % de S	≥99,9 % de S	≥99,9 % de S
acetoacetato de metilo	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R	98,5 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R	≥99,9 % de R
"rac": reducción no selectiva, es decir los dos enantiómeros se producen en proporción aproximadamente igual n.d = no determinado, ninguna reacción							

El exceso enantiomérico se calcula tal como sigue:

$$ee(\%) = ((R\text{-Alcohol} - S\text{-Alcohol}) / (R\text{-Alcohol} + S\text{-Alcohol})) \times 100$$

- 5 El potencial de las oxidorreductasas descritas con respecto a la oxidación y por consiguiente la idoneidad para la regeneración se comparó usándose el siguiente ensayo de actividad: 870 μ l de tampón TEA 100 mM, pH 8,0, 160 μ g de NAD, 10 μ l de lisado celular diluido. La reacción se inició mediante adición de 100 μ l de una solución de sustrato 100 mM a la mezcla de reacción.

En este caso se fijó el sustrato con la máxima actividad igual al 100 %.

Tabla 12: espectros de sustrato / oxidación

Sustrato	SEQ NO:1	ID	SEQ NO:2	ID	SEQ NO:3	ID	SEQ NO:4	ID	SEQ NO:5	ID	SEQ NO:6*	ID	SEQ NO:7	ID
S-2-octanol	0 %		0 %		0 %		0 %		0 %		0 %		0 %	
R-2-octanol	100 %		31 %		100 %		100 %		100 %		100 %		100 %	
S-2-butanol	1 %		20 %		30 %		2 %		2,5 %		<2 %		0 %	
R-2-butanol	3 %		100 %		58 %		18 %		14 %		60 %		50 %	
S-fenil-2-propanol	0 %		0%		0 %		0 %		0 %		0 %		0 %	
R-fenil-2-propanol	<1 %		20 %		50 %		2 %		25 %		0 %		50 %	
2-metil-4-pentanol	<1 %		20 %		10 %		1 %		2,5 %		0 %		0 %	
2-propanol	1,6 %		20 %		100 %		7 %		7 %		60 %		20 %	
ciclohexanol	0 %		20 %		0 %		0 %		0 %		0 %		0 %	
*oxidación apenas detectable														

- 10 Tal como es evidente a partir de las tablas 10-12, en el caso de las siete secuencias se trata claramente de oxidorreductasas R-específicas. Sin embargo, las enzimas sometidas a estudio se diferencian claramente en el espectro de sustratos preferidos así como en el comportamiento de oxidación. Se producen diferencias a este respecto en cuanto a la preferencia de sustratos de cadena corta, más bien de bajo peso molecular en comparación con compuesto de carbonilo de cadena larga, también se toleran bien de manera diferente sistemas aromáticos
- 15 distintos o también sustituyentes distintos (tal como halógeno).

Aunque se haga por tanto una selección de enzimas que si bien catalizan en principio reacciones similares, se establece para sustratos individuales que se encuentra entre éstas tanto aquellas enzimas que catalizan la reacción diana de manera extremadamente eficaz, como también aquéllas que no catalizan en absoluto la reacción diana.

- 20 Además se observan también diferencias en la enantioselectividad, que si bien a primera vista parecen insignificantes, sin embargo con una especificación habitual actualmente para aplicaciones farmacéuticas de ee> 99,0-99,9 % pueden ser absolutamente decisivas para la aplicabilidad de enzimas individuales para procedimientos de reducción específicos.

- 25 También las propiedades oxidativas y por consiguiente la aplicabilidad en distintos procedimientos con regeneración de coenzima acoplada con sustrato varían entre las enzimas sometidas a estudio así como también con respecto al estado de la técnica. El uso de las oxidorreductasas mencionadas en el procedimiento de acuerdo con la invención no representa por tanto ninguna alternativa equivalente con respecto al estado de la técnica existente, sino una ampliación del espectro existente.

Ejemplo 4: Comparación de las oxidorreductasas SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO: 7 en procedimientos especiales

- 30 Por medio de los ejemplos expuestos a continuación se mostrará ahora para algunos procedimientos especiales que las enzimas SEQ ID NO:1 a 7 pueden proporcionar soluciones especiales a cuestiones concretas, que superan también claramente el estado de la técnica existente.

4.a Reducción de 3,6-octanodiona para dar R,R-3,6-octanodiol

Para la selección de enzimas adecuadas para el desarrollo de un procedimiento con regeneración de coenzima acoplada con sustrato para la reducción de 3,6-octanodiona para dar R,R-3,6-octanodiol se sometieron a estudio todas las enzimas en la siguiente mezcla de reacción:

- 5 450 µl de tampón, pH =7,0
 0,05 mg de NAD
 50 µl de 2-propanol
 10 mg de 3,6-octanodiona

- 10 Tras incubación durante 24 h a 25 °C se extrajeron las muestras por medio de diclorometano y se analizaron mediante CG.

En la tabla 13 están indicadas las conversiones obtenidas y los productos de reacción .

Tabla 13

SEQ ID NO	3,6-octanodiona	producto (S) reducido una vez	producto (R) reducido una vez	S,S-3,6-octanodiol	R,R-3,6-octanodiol
SEQ ID NO: 1	95 %	0 %	5 %	0 %	0 %
SEQ ID NO:2	3 %	0 %	17 %	0 %	80 %
SEQ ID NO:3	10 %	0 %	45 %	0 %	45 %
SEQ ID NO:4	76 %	0 %	24 %	0 %	0 %
SEQ ID NO:5	95 %	0 %	5 %	0 %	0 %
SEQ ID NO:6	24 %	0 %	59 %	0 %	17 %
SEQ ID NO:7	43 %	0	47 %	0	10 %
documento WO 2007/012428 <i>Pichia farinosa</i>	85 %	0 %	15 %	0 %	0 %
documento WO 2007/012428 <i>Candida nemodendra</i>	95 %	0 %	5 %	0 %	0 %
documento EP 1179 595 A1 <i>Pichia finlandica</i>	3 %	0 %	17 %	0 %	80 %
documento WO 2004/027055 <i>Devosia</i>	40 %	0 %	50 %	0 %	10 %

- 15 Tal como es evidente a partir de la tabla 13, se encuentran entre las enzimas que están a disposición aquellas que en las condiciones de reacción mencionadas pueden reducir muy bien 3,6-octanodiona para dar el deseado R,R-octanodiol (SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y *P. finlandica*), aquellas que no aceptan en absoluto el sustrato (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5 y *C. nemodendra*) así como aquellas que deberían usarse preferentemente cuando se pretende preparar el compuesto reducido una vez (SEQ ID NO:4).

4.b Reducción de 2,7-dimetil-3,6-octanodiona para dar (S,S)-2,7-dimetiloctano-3,6-diol

- 20 Para la selección de enzimas adecuadas para un procedimiento con regeneración de coenzima acoplada con sustrato para la reducción de 2,7-dimetil-3,6-octanodiona para dar (S,S)-2,7-dimetiloctano-3,6-diol se sometieron a estudio las enzimas en la siguiente mezcla de reacción:

- 25 450 µl de tampón, pH =7,0
 0,05 mg de NAD
 50 µl de 2-propanol
 10 mg de 2,7-dimetil-3,6-octanodiona

Tras incubación durante 24 h a 25 °C se extrajeron las muestras por medio de diclorometano y se analizaron mediante CG.

En la tabla 14 están mencionadas las conversiones obtenidas y los productos de reacción.

Tabla 14

SEQ ID NO	2,7-dimetil-3,6-octanodiona	Meso	(S,S)-2,7-dimetiloctano-3,6-diol	(R,R)-2,7-dimetil-3,6-octanodiol
SEQ ID NO:1	100 %	0 %	0 %	0 %
SEQ ID NO:2	23 %	0	77 %	0 %
SEQ ID NO:3	100 %	0 %	0 %	0 %
SEQ ID NO:4	100 %	0 %	0 %	0 %
SEQ ID NO:5	100 %	0 %	0 %	0 %
SEQ ID NO:6	100 %	0 %	0 %	0 %
SEQ ID NO:7	100 %	0 %	0 %	0 %
documento WO 2007/012428 <i>Pichia farinosa</i>	100 %	0 %	0 %	0 %
documento WO 2007/012428 <i>Candida nemodendra</i>	100 %	0 %	0 %	0 %
documento EP 1179 595 A1 <i>Pichia finlandica</i>	100 %	0 %	0 %	0 %
documento WO 2004/027055 <i>Devosia</i>	100 %	0 %	0 %	0 %

5

Tal como es evidente a partir de la tabla 14, para esta cuestión específica la SEQ ID NO:2 proporciona una solución, por el contrario ninguna enzima del estado de la técnica puede catalizar la reacción deseada.

4.c Reducción de 2,4-pentanodiona para dar R,R-2,4-pentanodiol

10 Para la selección de enzimas adecuadas para un procedimiento con regeneración de coenzima acoplada con sustrato para la reducción de 2,4-pentanodiona para dar R,R-2,4-pentanodiol se sometieron a estudio las enzimas en la siguiente mezcla de reacción:

15 450 µl de tampón, pH =7,0
0,05 mg de NAD
50 µl de 2-propanol
10 mg de 2,4-pentanodiona

Tras incubación durante 24 h a 25 °C se extrajeron las muestras por medio de diclorometano y se analizaron mediante CG.

En la tabla 15 están mencionadas las conversiones obtenidas y los productos de reacción.

Tabla 15

SEQ ID NO	2,4-pentanodiona	compuesto reducido una vez (R)	(S,S)-2,4-pentanodiol	(R,R)-2,4-pentanodiol
SEQ ID NO: 1	0 %	70 %	0 %	30 %
SEQ ID NO:2	0 %	19 %	0 %	81 %
SEQ ID NO:3	2 %	95 %	0 %	3 %
SEQ ID NO:4	6 %	93 %	0 %	1 %
SEQ ID NO:5	60 %	40 %	0 %	0 %
SEQ ID NO:6	100 %	0 %	0 %	0 %
SEQ ID NO:7	7 %	91 %	0 %	2 %
documento WO 2007/012428 <i>Pichia farinosa</i>	100 %	0 %	0 %	0 %
documento WO 2007/012428 <i>Candida nemodendra</i>	55 %	45 %	0 %	0 %
documento EP 1179 595 A1 <i>Pichia finlandica</i>	30 %	70 %	0 %	0 %
documento WO 2004/027055 <i>Devosia</i>	43 %	57 %	0 %	0 %

Tal como es evidente a partir de la tabla 15, es posible la conversión de 2,4-pentanodiona en R,R-2,4-pentanodiol con las oxidoreductasas SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2. La mayoría de las enzimas convierten este sustrato solo hasta obtener el compuesto monorreducido. Tampoco el estado de la técnica ofrece en este caso ninguna solución.

Para la obtención eficaz del compuesto monorreducido se recomiendan a su vez las oxidoreductasas SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:7 aún antes del estado de la técnica.

4.e Reducción de 1,1,1-trifluoroacetona para dar R-1,1,1-trifluoropropanol

Para la selección de enzimas adecuadas para un procedimiento con regeneración de coenzima acoplada con sustrato para la reducción de 1,1,1-trifluoroacetona para dar R-1,1,1-trifluoropropanol se sometieron a estudio las enzimas en la mezcla de reacción citada a continuación.

La mezcla de reacción considera a este respecto el requerimiento especial en el procesamiento y conversión de este sustrato altamente volátil. En este caso no es posible la regeneración con isopropanol, más bien se prefiere en este caso el uso de metilpentanol para evitar por un lado un escape del sustrato volátil (p.e. = 22 °C) durante la reacción y para permitir por otro lado el procesamiento del producto de reacción R-1,1,1-trifluoropropanol (p.e. = 80 °C). (La separación de 2-propanol no sería posible debido a puntos de ebullición idénticos.)

450 µl de tampón, pH =7,0
0,05 mg de NAD
500 µl de 2-metil-4-pentanol
20 µl de 1,1,1-trifluoroacetona

Tras incubación durante 24 h a 25 °C se extrajeron las muestras se analizaron mediante CG.

En la tabla 16 están mencionadas las conversiones obtenidas y los productos de reacción.

Tabla 16

SEQ ID NO	1,1,1-trifluoroacetona	R-1,1,1-trifluoropropanol	S-1,1,1-trifluoropropanol
SEQ ID NO:1	0 %	99 %	1 %
SEQ ID NO:2	20 %	60 %	40 %
SEQ ID NO:3	2 %	70 %	30 %
SEQ ID NO:4	15 %	80 %	20 %
SEQ ID NO:5	50 %	85 %	15 %
SEQ ID NO:6	n.d	n.d	n.d
SEQ ID NO:7	n.d	n.d	n.d
documento WO 2007/012428 <i>Pichia farinosa</i>	0 %	97 %	3 %
documento WO 2007/012428 <i>Candida nemodendra</i>	50 %	99 %	1 %
documento EP 1179 595 A1 <i>Pichia finlandica</i>	50 %	99 %	1 %
documento WO 2004/027055 <i>Devosia</i>	n.d	n.d	n.d

Tal como es evidente en la tabla 16, ofrece en este caso la oxidorreductasa SEQ ID NO:1 el mejor compromiso entre la conversión y la selectividad. Sorprendentemente, la mayor parte de las enzimas no pueden en absoluto reducir este sustrato con enantioselectividad satisfactoria, de manera que otra vez la diversidad de las enzimas descritas se destaca con funcionalidad en principio igual.

4.f Reducción de 2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ona para dar (1S)-2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ol

Para la selección de enzimas adecuadas para un procedimiento con regeneración de coenzima acoplada con sustrato para la reducción de 2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ona para dar (1S)-2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ol se sometieron a estudio las enzimas en la siguiente mezcla de reacción:

400 µl de tampón, pH =7,0
0,02 mg de NAD
100 µl de 2-propanol
25 mg de 2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ona

Tras incubación durante 24 h a 25 °C se extrajeron las muestras y se analizaron mediante CG.

En la tabla 17 están mencionadas las conversiones obtenidas y los productos de reacción.

Tabla 17

SEQ ID NO	2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ona	(1R)-2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ol	(1S)-2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ol
SEQ ID NO:1	100 %	n.d	n.d
SEQ ID NO:2	55 %	0 %	45 %
SEQ ID NO:3	40 %	0 %	60 %
SEQ ID NO:4	99 %	n.d	n.d
SEQ ID NO:5	100 %	n.d	n.d
SEQ ID NO:6	25 %	0 %	75 %

(continuación)

SEQ ID NO	2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ona	(1R)-2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ol	(1S)-2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ol
SEQ ID NO:7	83 %	0 %	17 %
documento WO 2007/012428 <i>Pichia farinosa</i>	100 %	n.d	n.d
documento WO 2007/012428 <i>Candida nemodendra</i>	100 %	n.d	n.d
documento EP 1179 595 A1 <i>Pichia finlandica</i>	98 %	n.d	n.d
documento WO 2004/027055 <i>Devosia</i>	100 %	n.d	n.d

Tal como es evidente a partir de la tabla 17, es posible la conversión de 2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ona en (1S)-2-cloro-1-(3-hidroxifenil)etan-1-ol en principio con las oxidorreductasas SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7, convirtiendo estas enzimas el sustrato de manera absolutamente selectiva. Ninguna enzima del estado de la técnica puede reducir este sustrato especial.

4.g Reducción de 4-cloroacetoacetato de etilo para dar (S)-4-cloro-3-hidroxibutirato de etilo

A continuación se someten a estudio las enzimas que van a someterse a estudio SEQ ID NO:1-7 en el procedimiento industrial para la reducción de 4-cloroacetoacetato de etilo para dar (S)-4-cloro-3-hidroxibutirato de etilo y se comparan con el estado de la técnica.

Para ello se usó el sustrato 4-cloroacetoacetato de etilo de manera correspondiente al estado de la técnica (documento WO 2006/087235) en alta concentración (200 g/l) y se comparó la eficacia de las enzimas en el procedimiento con regeneración acoplada a sustrato con 2-propanol.

600 µl de tampón, pH =8,0
0,2 mg de NAD
200 µl de 2-propanol
200 µl de 4-cloroacetoacetato de etilo
240 µl de enzima recombinante de *E.coli* (20-60 unidades)

Tras incubación durante 24 h a 25 °C se extrajeron las muestras y se analizaron mediante CG.

En la tabla 18 están mencionadas las conversiones obtenidas y los productos de reacción.

Tabla 18

SEQ ID NO	4-cloroacetoacetato de etilo	(S)-4-cloro-3-hidroxibutirato de etilo	(R)-4-cloro-3-hidroxibutirato de etilo
SEQ ID NO:1	90 %	10 %	0 %
SEQ ID NO:2	0 %	100 %	0 %
SEQ ID NO:3	0 %	100 %	0 %
SEQ ID NO:4	70 %	30 %	0 %
SEQ ID NO:5	85 %	15 %	0 %
SEQ ID NO:6	60 %	40 %	0 %

(continuación)

SEQ ID NO	4-cloroacetoacetato de etilo	(S)-4-cloro-3-hidroxibutirato de etilo	(R)-4-cloro-3-hidroxibutirato de etilo
SEQ ID NO:7	75 %	25 %	0 %
documento WO 2007/012428 <i>Pichia farinosa</i>	100 %	n.d	n.d
documento WO 2007/012428 <i>Candida nemodendra</i>	100 %	n.d	n.d
documento EP 1179 595 A1 <i>Pichia finlandica</i>	80 %	20 %	0 %
documento WO 2004/027055 <i>Devosia</i>	75 %	25 %	0 %

5 Tal como es evidente a partir de la tabla 18, ofrecen en particular las enzimas SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3 para la reducción de 4-cloroacetoacetato de etilo para dar (S)-4-cloro-3-hidroxibutirato de etilo alternativas interesantes, dependientes de NADH a los procedimientos existentes, en la mayoría de los casos dependientes de NADPH. Las enzimas del estado de la técnica son por el contrario inadecuadas, dado que éstas muestran en condiciones de procedimiento solo conversiones insuficientes o incluso ninguna conversión.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> IEP GmbH

<120> Procedimiento para la reducción estereoselectiva de compuestos cetónicos

<130> I 13889

15 <160> 14

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
<211> 247
<212> PRT
<213> *Bacillus cereus*

25 <400> 1

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

ES 2 636 473 T3

165										170					175						
Ile	Arg	Ile	Asn	Ala	Val	Cys	Pro	Gly	Tyr	Ile	Asp	Thr	Pro	Leu	Leu						
			180					185					190								
Gly	Ser	Val	Asn	Pro	Gln	Gln	Lys	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Leu	His	Pro						
		195					200					205									
Gln	Gly	Arg	Leu	Gly	Thr	Pro	Glu	Glu	Val	Ala	Lys	Ala	Val	Leu	Phe						
	210					215					220										
Leu	Ala	Ser	Asp	Asp	Ala	Ser	Phe	Val	Asn	Gly	Thr	Thr	Leu	Leu	Val						
225					230					235					240						
Asp	Gly	Gly	Tyr	Thr	Ala	Arg															
				245																	

<210> 2
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> *Methylibium petroleiphilum*
 <400> 2

ES 2 636 473 T3

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

Met Lys Asn Gly Pro Gly Thr Gly Ser Ile Ile Asn Ile Ser Ser Ile
130 135 140

Glu Gly Ile Val Ala Asp Pro Lys Leu Ala Ser Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160

Gly Gly Val Arg Ile Phe Ser Lys Ser Ala Ala Leu His Cys Ala Gln
165 170 175

Ala Gly Tyr Arg Ile Arg Val Asn Thr Ile His Pro Gly Tyr Ile Trp
180 185 190

Thr Pro Met Val Glu Gly Tyr Leu Thr Ser Leu Gly Asp Val Glu Gly
195 200 205

Gly Arg Gln Val Ile Ser Lys Met His Pro Ile Gly Arg Met Gly Glu
210 215 220

Pro Asp Asp Ile Ala Tyr Gly Val Leu Tyr Leu Gly Ser Asp Glu Ser
225 230 235 240

Ser Phe Met Thr Gly Ser Glu Leu Val Ile Asp Gly Gly Tyr Thr Ala
245 250 255

Gln

<210> 3
<211> 251
<212> PRT
<213> *Mezorhizobium* sp.

<400> 3

Met Thr Gly Glu Phe Lys Asp Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Gly
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Ala Ala Ile Ala Arg Glu Leu Ala Thr Gly Gly Ala
20 25 30

Glu Leu Val Val Ala Asp Leu Glu Arg Glu Ser Ala Asn Arg Ile Val
35 40 45

Glu Gly Ile Arg Ala Ser Gly Gly Arg Ala His Ala Phe Ala Val Asp
50 55 60

Val Ala Asp Ala Glu Ala Val Glu Arg Met Val Asp Phe Ala Val Arg
65 70 75 80

Thr Cys Gly Asp Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Ser Glu Pro Thr Ala Asp Tyr Pro Leu Asp Gly Trp Arg Lys Val
100 105 110

Ile Asp Val Asn Leu Asn Gly Val Phe Tyr Gly Met Lys Tyr Glu Ile
115 120 125

Ala Ala Ile Leu Lys Ser Gly Gly Gly Ala Ile Val Asn Met Ala Ser
130 135 140

Ile Leu Gly Ser Val Gly Phe Ala Asn Ala Cys Ala Tyr Val Ser Ala
145 150 155 160

Lys His Ala Leu Leu Gly Leu Thr Lys Thr Ala Ala Met Glu Tyr Ala
165 170 175

Ala Gln Gly Val Arg Ile Asn Ala Val Gly Pro Ala Phe Ile Asp Thr
180 185 190

Pro Leu Leu Ser Lys Asn Leu Asp Asp Gln Val Leu Gly Gln Leu Ala
195 200 205

Gly Leu His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Pro Glu Glu Val Ser Ala
210 215 220

Leu Thr Cys Phe Leu Leu Ser Gly Arg Ala Ser Phe Ile Thr Gly Ser
225 230 235 240

Tyr His Leu Val Asp Gly Gly Tyr Thr Thr Arg
245 250

<210> 4
<211> 263
<212> PRT
<213> *Streptomyces colicoli*

<400> 4

Met Ser Thr Thr Gly Thr Thr Pro Ala Thr Thr Gly Tyr Ala Ala Glu
1 5 10 15

Phe Ala Gly Arg Thr Ala Leu Val Thr Gly Ala Ala Ser Gly Ile Gly
 20 25 30
 Leu Ala Thr Ala Arg Arg Leu Gly Ala Gly Gly Ala Arg Val Val Val
 35 40 45
 Ala Asp Phe Asn Ala Glu Gly Ala Glu Lys Ala Ala Ala Glu Leu Arg
 50 55 60
 Ala Gly Gly Val Glu Ala Ala Ala Val Glu Leu Asp Val Thr Arg Pro
 65 70 75 80
 Glu Ser Val Glu Ala Ala Val Gly Phe Ala Val Asp Thr Phe Gly Ser
 85 90 95
 Leu Asp Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly Pro Ser Ala Pro
 100 105 110
 Thr Gly Glu Tyr Asp Val Ala Ala Tyr Gln Arg Val Val Arg Thr Asn
 115 120 125
 Leu Asp Gly Val Phe Tyr Ser Met Arg Tyr Glu Leu Pro Ala Ile Glu
 130 135 140
 Ala Ala Gly Lys Gly Gly Ser Ile Val Asn Val Ala Ser Ile Leu Gly
 145 150 155 160
 Ser Val Gly Phe Ala Gly Ser Pro Ala Tyr Val Ala Ala Lys His Gly
 165 170 175
 Val Val Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Gly
 180 185 190
 Ile Arg Ile Asn Ala Val Gly Pro Gly Phe Ile Asp Thr Pro Leu Leu
 195 200 205
 Lys Thr Met Asp Glu Ala Ala Tyr Lys Gly Leu Val Ala Leu His Pro
 210 215 220
 Ala Gly Arg Leu Gly Arg Ser Glu Glu Val Ala Glu Leu Ile Ala Phe
 225 230 235 240
 Leu Leu Ser Asp Arg Ala Ser Phe Val Ala Gly Ser Tyr His Leu Val
 245 250 255

ES 2 636 473 T3

Asp Gly Ala Tyr Thr Ala Val
260

5
<210> 5
<211> 253
<212> PRT
<213> *Ralstonia atropa*

<400> 5

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

ES 2 636 473 T3

195

200

205

Leu Val Ala Ala His Pro Ile Gly Arg Leu Gly His Ala Asp Glu Val
210 215 220

Ala Lys Ala Val Leu Phe Leu Ala Ser Asp Asp Ala Ser Phe Ile Val
225 230 235 240

Gly Thr Ser Leu Met Val Asp Gly Gly Tyr Cys Ala Gln
245 250

<210> 6

<211> 252

<212> PRT

<213> *Herpentosiphon aurantiacus*

<400> 6

5

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

Ala Lys His Ala Val Val Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala Leu Asp Tyr
165 170 175

Gly Arg Gln Gly Leu Arg Ile Asn Ser Val Gly Pro Gly Phe Ile Lys
180 185 190

Thr Pro Leu Leu Asp Gly Gly Leu Asp Asp Gln Thr Gln Thr Tyr Leu
195 200 205

Ser Gly Leu His Ala Val Gly Arg Met Gly Glu Ser Ala Glu Val Ala
210 215 220

Ala Leu Val Ala Phe Leu Cys Ser Ala Glu Ala Ser Phe Leu Thr Gly
225 230 235 240

Gly Tyr Tyr Leu Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
245 250

<210> 7

<211> 249

<212> PRT

<213> *Paracoccus desnitrificas*

<400> 7

5

ES 2 636 473 T3

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

Ser Gly Leu Gly Glu Ala Ile Ala Leu Glu Leu Ala Ala Ser Gly Ala
20 25 30

Thr Val Val Ala Ala Asp Leu His Glu Ala Thr Ala Arg Ala Thr Ala
35 40 45

Asp Arg Ile Val Ala Ala Gly Gly Lys Ala Lys Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Ser Asp Pro Asp Ala Val Arg Lys Ala Val Glu Val Ala Lys Gly
65 70 75 80

Leu Gly Gly Leu His Leu Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly Pro
85 90 95

Ser Ala Pro Val Gly Asp Tyr Pro Leu Asp Gly Trp Lys Lys Val Ile
100 105 110

Asp Val Asn Leu Asn Ala Val Phe Tyr Gly Met Arg Tyr Gly Ile Pro
115 120 125

Ala Met Leu Asp Ala Gly Gly Gly Ala Ile Val Asn Met Ala Ser Ile
130 135 140

Leu Gly Ser Val Gly Phe Asn Gly Ala Gly Ala Tyr Val Ser Ala Lys
145 150 155 160

His Ala Val Val Gly Met Thr Lys Asn Ala Ala Leu Glu Tyr Ala Gln
165 170 175

Lys Gly Ile Arg Val Asn Ser Val Gly Pro Ala Phe Ile Asp Thr Pro
180 185 190

Leu Leu Asp Gln Leu Asp Ser Asp Thr Arg Gln Ala Leu Val Gly Arg
195 200 205

His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Arg Ala Asp Glu Val Ala Gly Leu Val
210 215 220

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

Leu Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Leu
245

<210> 8
<211> 744
<212> ADN
<213> *Bacillus cereus*

<400> 8

atgaaattaa aagacaaagt agcaatcata actggtggtg caagtggaat tggcgaatct 60
actgttcgtc tttttatcga agaaggtgca aaagtagtta ttgctgactt ttctgaacgt 120
ggaaaagaac tatcagatga attgaatgca catggatata atacgttatt tattaaaacc 180
gatgtaacaa aagaggcaga tattaacag ctaattcatg agacagtaag tacatacggg 240
aaattagata ttatgtatgc caatgccggc gttgctgatg atgcaccggc aaacgaatta 300
tcctatgaaa agtggaaaaag aactattgat attaatttgt ctgggggtatt cctttctgat 360
aaatattcga ttgaacaatt tcttaaaciaa ggtacagggtg gtgtcatcgt taacgctggt 420
tcgattcata gttttgtttc attacctaca ccaacagcat actcctctgc aaaagggtggt 480
gtgaaactat taactcaaaa tttatgtact gcctacgcta aatatggaat acgtattaac 540

gcggtgtgcc ctggttatat tgacaccctt ttactaggta gtgttaatcc tcaacagaaa 600
gaatatttag cttcacttca tccacaaggc agacttgga caccagaaga agtcgctaaa 660
gctgtcttat ttttagcaag tgatgatgct agttttgtta acggcacaac acttcttggt 720
gatggaggct atactgcacg ttaa 744

<210> 9
<211> 774
<212> ADN
<213> *Methylibium petroleiphilum*

<400> 9

atgggacgtg tggacaaciaa ggtggcgctg gtgaccggtg gtgccaaggg catcggccgg 60
gccagcgcac tgatgctggc gcgcgaaggt gcccgcgtgg tgctgaccga cgtggaagag 120
gcgcagggca gcgcggtggc gaaggagatc gagcgcgccg gcggcaaggc gctgttcctc 180
acgcaggacg tgaccgacga gagccgctgg gtgcagggtg tcgagaaggc ccgcgcgcag 240
ttcggcggcc tgaacatcgt cgtcaaciaa gccggcatcg gcaccgctgg cagcgccgag 300
gacgagacgc tggaggcctg gcgcgcgctg atgtccgtca acctcgacgg cgtcttcctc 360
ggcaccaagc acgcgatccg ggcgatgaag aacgggcccg gcacgggctc gatcatcaac 420
atctcgtcga tcgagggcat cgtcgccgac cccaagctcg cgtcctaciaa cgccagcaag 480
ggcggcgtgc gcatcttctc gaagtcggcg gcaactgcatt gcgcgcaggc gggctaccgc 540
atccgggtta acaccatcca tccgggctac atctggacgc cgatggtcga aggctatctg 600
accagcctcg gcgatgtcga ggggtggcgc caggctcatct cgaagatgca cccgatcggg 660
cggatgggtg agcccagca catcgccctac ggtgtgctct acctgggctc cgacgagtc 720
tcgttcatga cgggcagcga gctggctatc gacggcggtc acaccgcga atag 774

<210> 10

<211> 756
 <212> ADN
 <213> *Mesorhizobium* sp.

5 <400> 10

```

atgactggtg aattcaagga caaggttgcg ctcgtcacag gagccggctc ggggataggg      60
gccgcaatcg ctcgcgaaact ggccacagga ggcgccgagc tggtcgtcgc cgacctggag      120
cgggagtcctg cgaacaggat cgtggaagga atccgagcga gtggaggccg agcccacgcc      180
tttgccgtgg atgtagccga cgcgaggcg gtcgagcgca tggtaggattt tgccgttcgc      240
acgtgcggtg accttcatct ggcggtcaat aatgctggga tcggcgcccc aagcgaaccg      300
accgcgact atccgctcga cggctggcgc aaggtgatcg atgtcaatct gaatggcgctc      360
ttctatggca tgaaatatga gatcgacagc atactgaaat ccggcggcgg cgccatcgctg      420
aacatggcat ccatcctcgg ttcagtggga tttgcgaatg cctgcgccta tgtctccgcg      480
aaacacgcgc tgctgggact gacaaaaacg gcggcgatgg agtatgcggc acaaggcgtg      540
cgcatcaatg cggtcggggc agctttcatc gacacgccgc ttctgtcgaa aaacctcgac      600
gaccaagtcc tcggccagct cgcgggactt catcccatcg gccggctcgg cagcctgag      660
gaggctcggc cgctcacctg tttcttgctt tccggacgcg cgagcttcat caccggcagt      720
tatcatctcg tcgatggcgg ctacaccacc cggtaa                                756
    
```

10 <210> 11
 <211> 792
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces coelicolor*

15 <400> 11

atgagcacca ccggaaccac ccccgccacc accgggtacg ccgccgagtt cgccggccgt 60
accgccctcg tcaccgggtgc cgcctccggt atcggcctgg ccaccgcccg ccggctcggc 120
gccggcggcg cccgggtcgt cgtcgccgac ttcaacgccg agggcgccga gaaggccgcc 180
gccgagctgc gggccgggtg cgtcgaggcc gcccgggtcg agctggacgt caccggtccg 240
gagtccgtcg aggcggccgt cgggttcgcc gtcgacacgt tcggctcgct ggacctcgcc 300
gtcaacaacg ccggcatcgg cgccccagc gcccgcaccg gcgagtacga cgtggcggcc 360
taccagcgcg tcgtgcgcac caacctcgac ggcgtcttct actcgatgcg ctacgaactg 420
cccgccatcg aggcggccgg caaggcgccg tcgatcgtga acgtcgccctc catcctcggc 480
tcggctcggct tcgccggctc ccccgccctac gtcgccgcca agcacggcgt ggtcgggctg 540
acgaaggcgg ccgccgccga gtacgccgcc cgcggcatcc ggatcaacgc ggtcgggtccg 600
ggcttcatcg acacccccct gctcaagacc atggacgagg ccgcctacaa ggggctggtc 660
gccctgcacc cggccggccg cctcggggcg tccgaggagg tcgcggagct gatcgccctc 720
ctgctgtccg accgcgcgtc ctctgctcgc ggcagctatc acctggtcga cggcgccctac 780
accgccgtct ga 792

<210> 12
<211> 762
<212> ADN
<213> *Ralstonia eutropha*
<400> 12

atggagtaca tcgacatgaa gctcaaggac aaggctcgcca tcgtaacggg cgggtgccagc 60
ggtattggcg aggcaacggt tcggctgttc gcttcccaag gtgccagcgt cgtcattgcc 120
gaccgctcgg cactcggcga gaagctcgcg cgtgaactga gcgaaagcag cttggccgcg 180
cactacagcg aagtcgatgt gtcgcgcgag gacgacacgc gcaggctcat cgatgacacc 240
gtgagccgct tcgggcggct cgacatcatg gtcgccaatg ccggcattgc gcatccgtct 300
gcaccagtcg aggatgtcag tgtcgagcaa tggcagcaga tgatcgacgt caacctgacc 360
ggcgtcttcc tgagcaacaa gcttgccatt gtgcagatga agaagcaggg caccggcggc 420
gcgatcgtea acatggcatc gatactcggg catgtcggga tgccggggcg ggcgtcctac 480
aacgcggcaa agggcggcgt ggtcaacctc acgcgctctc tcggcgtctc gcatgcacag 540
gacggcatac gcgtaacgc ggtatgtccg ggtttcgtgg caacaccgct gatogaacgt 600
gccactgagg aagcccgtgc gcgcctggtg gcggcgcatc cgattggccg cctgggtcac 660
gccgatgagg tcgcgaaggc cgtgctgttt ctgcgcgagcg acgatgcac gtctcatcgtc 720
ggtacgagcc tgatggtcga tggagggtat tgcgcgcaat ga 762

ES 2 636 473 T3

<210> 13
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> *Herpentosiphon aurantiacus*

5

<400> 13

```

atgaaccagt atgactttcg tggaaaagtg gcgcttgtca ccggcggcgc ctcggggatt      60
gggtgcggcgt gcgtgcatac ctttgccgct ggccggcgcga aggtcgcgat tgttgatcgc      120
aatcaggatc tgggcgcaca aaccgtggcg gcggtccgcg aggcgggcgg cgatgcgatc      180
tttctcccg tggatgtcgc ccaatcaggg gccgttgagg cgatggttac cgacaccatc      240
acggcctttg gacagctgga tattgcggtc aataatgccg ggatcggcgg cgagtctaata      300
cctaccggca cctacagcat tgaaggttgg cagacggtca ttgatgtgaa cctcaacggt      360
gtcttctatt gcatgcgcta cgaaattcca gccatgctgg cgcagggcgg cggcgtgatc      420
gtgaatatgg cctcgatcct agggactgtc ggatttgctt cctcccagc ctatgtcgcc      480
gccaagcacg cgggtggttg tctaccaag gccgccgcc tggactatgg gcgccaaggg      540
ctgcggatca actcggtcgg gccgggcttt atcaaaacac cactgcttga cgggtggcctg      600
gacgatcaga cccaaacctt tctgagcggg ctccacgccg tcggacgcat gggcgagtca      660
gcggaagtcg cggcgctggt cgcctttctc tgetccgctg aggcctcatt cctgacgggt      720
ggctattatc tggtcgatgg tggatacacg gcgcaataa      759
  
```

10

<210> 14
 <211> 750
 <212> ADN
 <213> *Paracoccus denitrificans*

15

<400> 14

atggacattc gtttcgacaa caagatcgcc cttgtgaccg gcgcccggctc ggggctgggc	60
gaggcgatag cgctggagct tgccgcctcg ggcgccacgg tggtagccgc cgacctgcat	120
gaagcgacag cccgcgccac cgccgacagg atcgtcgagg cgggcggcaa ggccaaggcc	180
gtggcggggc atgtctccga tcctgatgcg gtgcgcaagg ccgtcgaggt cgccaagggg	240
ctgggcgggc tgcacctgct ggtgaacaat gccggcatcg gcggccccag cgcgcgggtc	300
ggggactatc cgctggacgg ctggaaaaag gtcacgacg tcaacctgaa cgcggtcttc	360
tacggcatgc gctacgggat tccggcgatg ctggacgcgg gcggcggggc gatcgtgaac	420
atggcctcga tcctgggctc ggtcgggttc aacggcgagg gcgcctatgt ctcgccaag	480
catgccgtgg tgggcatgac caagaacgcg gcgctggaat atgcgcaaaa gggcatccgg	540
gtgaactcgg tcggcccggc cttcatcgac acgcgcgtgc tcgaccagtt ggacagcgac	600
accaggcagg cgctggtcgg ccgccatccc atcggcgggc tgggcggggc ggacgaggtt	660
gcggggcttg tcgtgttcct gctttcggac cgcgccagct tcatcacggc cagctatcac	720
ctggtggatg gcggctatac ggcgctgtga	750

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la reducción enzimática estereoselectiva, en particular enantioselectiva, de compuestos cetónicos para dar los correspondientes compuestos de hidroxilo quirales, en el que los compuestos cetónicos se reducen con una oxidoreductasa bacteriana enantioselectiva, específica de NADH, **caracterizado porque** para la reducción de los compuestos cetónicos se usa un polipéptido que presenta una signatura de R-ADH H-[P; A]-[I; A; Q; V; L]-[G; K]-R en la posición 205-209 y las siguientes características estructurales adicionales en su totalidad:

- (i) un plegamiento de Rossmann N-terminal GxxxGxG,
- (ii) un motivo NAG en la posición 87,
- (iii) una triada catalítica, que está constituida por S 139, Y 152 y K 156,
- (iv) un resto de aminoácido cargado negativamente en la posición 37,
- (v) dos motivos C-terminales en el dominio de dimerización [A; S]-S-F y [V; I]-DG-[G; A]-Y-[T; C; L]-[A; T; S]-[Q; V; R; L; P],
- (vi) Val o Leu en la posición 159,
- (vii) Asn en la posición 178, y
- (viii) un resto de prolina en la posición 188,

en el que la posición de las características estructurales está determinada por la comparación de aminoácidos multidireccional con la matriz de puntuación BLOSUM 62 con la secuencia de referencia 2bhd_Strex con la secuencia de aminoácidos:

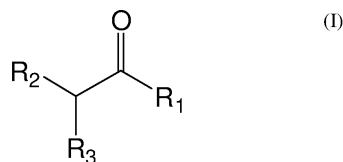
```
MHDLTGKNV IITGGARGLGAEARQAVAAGAHVLITDVLDDGGENAARELGDRARFLHHD
VTSEEDWSRAADFAVTEFGALHGLVNNAGISTGTPLESESVDHFRKVLVDVNLTVGVFIGMK
TVVPALKEAGGGSIVNISSAAGLMGLALTAGYGASKWGVRLTKIGAVEWGTARVRVNSV
HPGMTYTPMTAAVGIERGEKYPNTPMGRVGEADEIAGAVVFLLSDAASYVTGAELAVDG
GWTTGPTVAYVMGQ
```

y las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:7.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** para la reducción de los compuestos cetónicos se usa una oxidoreductasa funcional,

- (a) que presenta una de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:7 o
- (b) en la que al menos el 70 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de una de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:7 o
- (c) a la que codifica una secuencia de ácido nucleico del grupo que está constituido por SEQ ID NO:8 a SEQ ID NO:14 o
- (d) a la que codifica una secuencia de ácido nucleico que hibrida con una de las secuencias de ácido nucleico mencionadas en (c) en condiciones rigurosas.

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** se usan compuestos cetónicos de fórmula general I



en la que R₁, R₂ y R₃ independientemente se seleccionan del grupo que está constituido por

- 1) -H, con la condición de que R₁ no sea H,
- 2) alquilo (C₁-C₂₀), en el que alquilo es de cadena lineal o de cadena ramificada,
- 3) alquenilo (C₂-C₂₀), en el que alquenilo es de cadena lineal o de cadena ramificada y eventualmente contiene hasta cuatro dobles enlaces,
- 4) alquinilo (C₂-C₂₀), en el que alquinilo es de cadena lineal o de cadena ramificada y eventualmente contiene hasta cuatro triples enlaces,
- 5) arilo (C₆-C₂₄),
- 6) alquil (C₁-C₈)-arilo (C₆-C₁₄),
- 7) heterociclo (C₅-C₁₄),
- 8) cicloalquilo (C₃-C₇),

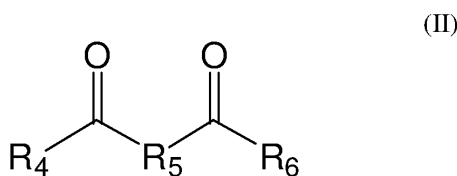
en el que los restos mencionados anteriormente en 2) a 8) están no sustituidos o independientemente entre sí están

mono-, di- o tri-sustituidos con -OH, halógeno, -NO₂, -NH₂, -NHP y/o -M, en donde P representa alquilo (C₁-C₇), alquenilo (C₂-C₇), alquinilo (C₂-C₇), arilo (C₆-C₁₄) o un grupo protector seleccionado de benciloxycarbonilo, trifenilmetilo y t-butilcarbonilo y M representa alquilo (C₁-C₇), alquenilo (C₂-C₇), alquinilo (C₂-C₇), arilo (C₆-C₁₄) o alquil (C₁-C₈)-arilo (C₆-C₁₄), en donde arilo (C₆-C₁₄) en alquil (C₁-C₈)-arilo (C₆-C₁₄) está no sustituido o está mono-, di- o tri-sustituido con halógeno y

9) -CH₂-X-R, en el que X representa O o S y R se selecciona de alquilo (C₁-C₇), fenilo y bencilo, en donde fenilo y bencilo están mono-, di- o tri-sustituidos con alquilo (C₁-C₇), -S-alquilo (C₁-C₃), -O-alquilo (C₁-C₃), -NO₂, -SCF₃, halógeno, -C(O)-alquilo (C₁-C₃) y/o -CN,

o R₁ con R₂, R₁ con R₃ o R₂ con R₃ forman un anillo con 3-6 átomos de C, que está no sustituido o independientemente entre sí está mono-, di- o tri-sustituido con -OH, halógeno, -NO₂, -NH₂, -NHP y/o -M y el otro resto se selecciona de los restos mencionados anteriormente en 1) a 9).

4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** como compuestos cetónicos se usan dicetonas de fórmula general II



en la que

R₅ representa (CH₂)_n con n = 0 - 20, arilo (C₆-C₁₄) o heterociclo (C₅-C₁₄), R₄ y R₆ independientemente entre sí representan alquilo (C₁-C₂₀) o un grupo éster, en la que R₄, R₅ y R₆ están no sustituidos o independientemente entre sí están mono-, di- o tri-sustituidos con alquilo (C₁-C₄), -OH, halógeno, -NO₂ y/o -NH₂.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque**

- el cofactor NAD oxidado formado mediante la oxidoreductasa/deshidrogenasa se regenera continuamente y
- para la regeneración del cofactor se usa un alcohol secundario con la fórmula general R_xR_yCHOH, en la que R_x y R_y independientemente entre sí es un grupo alquilo C₁-C₈ ramificado o no ramificado y C_{en total} ≥ 3.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado porque** como cosustrato o alcohol secundario se usa un alcohol del grupo que está constituido por 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-heptanol y 2-octanol, preferentemente 2-propanol.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el compuesto cetónico se usa en una cantidad del 3 % al 50 %, preferentemente del 5 % al 40 %, en particular del 10 % - 30 %, con respecto al volumen total.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el TTN (*total turn over number* = mol de compuesto cetónico / mol de cofactor usado) es ≥ 10³.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** se realiza en un sistema de dos fases orgánico acuoso.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** se usa adicionalmente un disolvente orgánico, seleccionado de dietiléter, terc-butilmetiléter, diisopropiléter, dibutiléter, acetato de etilo, acetato de butilo, heptano, hexano y ciclohexano.