

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 272**

51 Int. Cl.:

C12P 7/02 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2009 PCT/EP2009/061974**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2010 WO10031776**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2009 E 09783054 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2334801**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de L-fenilefrina mediante uso de una alcoholdehidrogenasa**

30 Prioridad:

17.09.2008 EP 08164488

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

11.04.2018

73 Titular/es:

**SIEGFRIED AG (100.0%)
Untere Brühlstrasse 4
4800 Zofingen, CH**

72 Inventor/es:

**BREUER, MICHAEL;
PLETSCH, ANDREAS;
HAUER, BERNHARD y
SIEGEL, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 663 272 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 preparación de L-fenilefrina mediante uso de una alcoholdehidrogenasa

5 La presente invención se refiere a un procedimiento en varias etapas para la preparación de alcoholes ópticamente activos sustituidos, que comprende una etapa de síntesis con catálisis enzimática, catalizada por una alcoholdehidrogenasa. En particular el procedimiento de acuerdo con la invención es adecuado para la preparación de fenilefrina, es decir 3-[(1R)-1-hidroxi-2-metilamino-etil]-fenol.

Base de la invención:

10 La fenilefrina es un principio activo farmacológico del grupo de los simpatomiméticos y posee actividad agonística en el receptor α_1 -adrenérgico. Es estructuralmente igual a la adrenalina, excepto por el grupo 3-hidroxilo faltante y encuentra aplicación principalmente como vasoconstrictor local. Como principio activo en gotas nasales actúa con ello como descongestionante en la mucosa. En gotas para los ojos actúa además como midriático, por consiguiente conduce a una dilatación de las pupilas.

15 La preparación de fenilefrina está ya descrita en la literatura. Aparte de los numerosos procedimientos, que producen el producto deseado como racemato y a continuación mediante una escisión con un agente auxiliar quiral adecuado transforman en el producto, se consideran como preferidos los métodos para la síntesis estereoselectiva, puesto que mediante ellos puede evitarse la destrucción no económica del enantiómero equivocado que puede llegar hasta 50%.

20 Entre los procedimientos de preparación conocidos a partir del estado de la técnica de clorhidrato de L-fenilefrina se cuenta la hidrogenación asimétrica del clorhidrato N-benci-N-metil-2-amino-m-benciloxiacetofenona proquiral de acuerdo con Tetrahedron Letters 30 (1989), 367- 370, o Chem. Pharm. Bull. 43 (5) (1995) 738-747.

25 Achiwa et al. describen en Tetrahedron Letters 30 (1989), 367 - 370 la hidrogenación asimétrica de clorhidrato de 3-benciloxi-2-(N-bencil-N-metil)-aminoacetofenona como sustrato, con hidrógeno en presencia de $[\text{Rh}(\text{COD})\text{Cl}]_2$ / (2R,4R)-4-(diciclohexilfosfino)-2-(difenilfosfino-metil)-N-metil-aminopirrolidina como catalizador. Inmediatamente después de la filtración y concentración de la mezcla de reacción se escinde el grupo protector de nitrógeno bencilico y se obtiene como producto fenilefrina. Al respecto surge, aparte del enantiómero L, el enantiómero D con una proporción de por lo menos 7,5% como contaminante (85% ee). Para la reacción tiene que usarse el catalizador, referido al sustrato, en una relación molar de 1: 2000. La desventaja de este procedimiento consiste esencialmente en que la L-fenilefrina obtenida no puede ser purificada de modo económico a una pureza de por lo menos 98% ee necesaria para la aplicación como medicamento.

30 En Chem. Pharm. Bull. 43 (5) (1995) 738 - 747 se indica como preferida para la hidrogenación asimétrica, una relación molar de sustrato a catalizador de aproximadamente 1000: 1. Sin embargo, a pesar del uso de grandes cantidades de catalizador en la etapa asimétrica de reacción, el producto no puede ser preparado con la suficiente pureza como enantiómero L para propósitos farmacéuticos, sin costosos procedimientos de purificación, sino que es accesible sólo como mezcla con una proporción relativamente alta de enantiómero D como impureza. También el relativamente largo tiempo de reacción de la etapa de hidrogenación asimétrica, de aproximadamente 20 horas, representa justamente para la fabricación de L-fenilefrina a escala industrial, una etapa de reacción muy elaborada en equipos y costosa, con un riesgo de seguridad no despreciable.

40 El procedimiento enseñado en WO 00/43345 satisface algunas de las condiciones mencionadas para una fabricación razonablemente económica de clorhidrato de L-fenilefrina, aunque tampoco puede aquí renunciarse al uso de grupos protectores, por lo cual el procedimiento se torna poco económico. Además también después de este procedimiento para la etapa estereoselectiva surge el producto deseado sólo con 93% ee, de modo que aquí también tiene que seguir una costosa purificación.

45 En Tetrahedron Asymmetry 18 (15) (2007) 1799 - 1803 se investigó la actividad y enantioselectividad de la deshidrogenasa YMR226c de *S. cerevisiae* con una serie de cetonas. Se describe que la deshidrogenasa YMR226c cataliza reducciones enantioselectivas de acetofenonas sustituidas con arilo, α -cloracetofenonas, cetonas alifáticas y α - y β -cetoésteres.

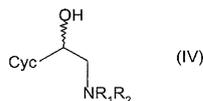
El documento WO 2005/108590 describe un procedimiento para la preparación de alcoholes ópticamente activos, mediante la reducción enantioselectiva, usando la feniletanol-deshidrogenasa de *Azoarcus sp* EbN1.

Breve descripción de la invención:

50 Por ello es objetivo de la presente invención el suministro de un novedoso procedimiento para la preparación de alcoholes ópticamente activos, como L-fenilefrina, el cual sea ejecutable de manera más económica, en comparación con el estado de la técnica. En particular tal procedimiento mejorado debería ser manejado sin el uso

de grupos protectores y debería poseer una elevada selectividad espacial.

De manera sorprendente, el objetivo anterior pudo ser logrado mediante el suministro de un procedimiento para la preparación de alcoholes ópticamente activos sustituidos de la fórmula IV, como sigue:



5 en la que

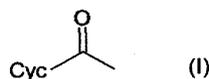
Cyc representa un anillo mono o polinuclear, saturado o insaturado, carbocíclico o heterocíclico, dado el caso sustituido una o varias veces, el cual porta al menos un grupo hidroxilo libre, y

R₁ y R₂ independientemente uno de otro representan H o un radical alquilo dado el caso sustituido una o varias veces, o de sales de este compuesto,

10 en cada caso en forma de estereoisómero puro o como mezcla de estereoisómeros,

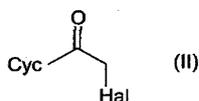
en el que

a) una cetona de la fórmula



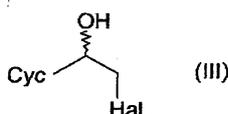
en la que Cyc posee los significados indicados anteriormente,

15 en presencia de un alcohol alifático reacciona con un agente de halogenación hasta dar un compuesto halogenado de la fórmula II



en la que Cyc posee los significados indicados anteriormente y Hal representa un átomo de halógeno,

20 b) el compuesto así obtenido de la fórmula II es reducido por vía enzimática usando una enzima elegida de entre alcoholdehidrogenasas (ADH) (E.C. 1.1.1.1), hasta dar alcohol de la fórmula III



en la que Cyc y Hal poseen los significados indicados anteriormente, y

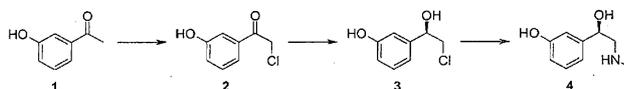
c) el alcohol de la fórmula III así obtenido reacciona con una amina de la fórmula HNR₁R₂,

en la que R₁ y R₂ poseen los significados indicados anteriormente,

25 hasta dar el compuesto de la fórmula IV.

Resumiendo, la presente invención hace posible en particular un procedimiento sorprendentemente ventajoso para la preparación del principio activo fenilefrina (3-[(1R)-1-hidroxi-2-metilamino-etil]-fenol; 4). Esta forma preferida de realización puede ser representada mediante el siguiente esquema de reacción:

Esquema 1



30 Al respecto, uno de los dos pasos clave es la cloración selectiva de la cadena lateral de 3'-hidroxiacetofenona (3-hAP, 1) hasta 3'-hidroxi-2-cloroacetofenona (HCAP, 2).

El segundo paso clave se refiere a la reducción enantioselectiva de HCAP (2) hasta (R)-3-(2-cloro-1-hidroxietil)-fenol (HCPE, 3), usando una enzima, y concretamente una alcoholdehidrogenasa (ADH).

El procedimiento suministrado de acuerdo con la invención se diferencia claramente en algunos puntos esenciales del estado de la técnica discutido anteriormente.

- 5 Es decir, la totalidad de la síntesis ocurre bien sin el uso de grupos protectores, por lo cual el procedimiento es más económico frente al del estado de la técnica. Esto es especialmente sorprendente e inesperado para la primera etapa.

Mediante el uso de la alcoholdehidrogenasa como catalizador de hidrogenación, es posible un acceso más económico a (R)-3-(2-cloro-1-hidroxietil)-fenol (HCPE, 3) con alta pureza óptica. No se forma en cantidades dignas de mencionarse el enantiómero indeseado. (Los valores %ee para el enantiómero deseado están en el intervalo de >98%, como por ejemplo >99% a aproximadamente 100%, como por ejemplo aproximadamente 99,9 %).

10 La reacción puede ser ejecutada (sin estar limitados por ello) además en un sistema de dos fases de solvente orgánico y agua, lo cual hace posible además un trabajo más económico. Al respecto, es posible una transformación más completa de la acetona hasta el alcohol deseado. El procesamiento de la mezcla es particularmente beneficioso por el carácter bifásico, porque el producto es separado de los residuos de catalizador (proteína) mediante extracción. Además, el uso de la fase orgánica reduce la exposición del biocatalizador con la cetona fenólica de bajo peso molecular, mediante lo cual se evita una inactivación y/o inhibición del catalizador.

Descripción de la figura:

20 La figura 1 muestra la secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos de la feniletanol-deshidrogenasa de (*Azoarcus sp*) *Aromatoleum aromaticum* EbN1 (SEQ ID NO: 1 o 2).

Descripción detallada de la invención:

1. Formas preferidas de realización

Un primer objetivo de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de alcoholes ópticamente activos sustituidos de la fórmula IV



en la que

30 Cyc representa un anillo mono o polinuclear, en particular mononuclear, con 4 a 7 miembros, en particular 5 o 6 miembros, saturado o insaturado, en particular insaturado, sobre todo aromático, carbocíclico o heterocíclico, en particular carbocíclico, el cual porta al menos un grupo hidroxilo libre, y dado el caso está sustituido una o varias veces, en el que en el caso de un anillo de 6 miembros el(los) grupo(s) hidroxilo están en particular en posición meta respecto a la cadena lateral de Cyc que porta grupos amino; y

R₁ y R₂ independientemente uno de otro representan H o radicales alquilo iguales o diferentes, dado el caso sustituidos una o varias veces;

35 o de sales de este compuesto, como por ejemplo sales de adición ácida de en particular ácidos inorgánicos, como HCl; en cada caso en forma de estereoisómero puro, como por ejemplo la forma (R) o (S), o como mezcla de estereoisómeros, como por ejemplo racematos,

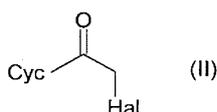
en el que

a) una cetona de la fórmula I



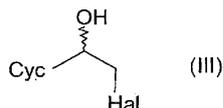
en la que Cyc posee los significados indicados anteriormente,

reacciona en presencia de un alcohol alifático halogenado, como en particular clorado, y concretamente en particular con cloruro de sulfuro, hasta dar un compuesto halogenado, en particular clorado, de la fórmula II



en la que Cyc posee los significados indicados anteriormente y Hal representa un átomo de halógeno, como por ejemplo F, Br o en particular Cl;

- 5 b) el compuesto de la fórmula II así obtenido, dado el caso después de un aislamiento o enriquecimiento previo, es reducido por vía enzimática usando una enzima elegida de entre alcoholdehidrogenasas (ADH) (E.C. 1.1.1.1) hasta dar el alcohol de la fórmula III



en la que Cyc y Hal poseen los significados indicados anteriormente; y

- 10 c) el alcohol de la fórmula III así obtenido, dado el caso después de aislamiento o enriquecimiento previo, reacciona con una amina de la fórmula HNR_1R_2 , en la que R_1 y R_2 poseen los significados indicados anteriormente, hasta dar el compuesto de la fórmula IV y éste es aislado dado el caso de la mezcla de reacción, dado el caso en forma de estereoisómero puro.

Las cetonas de la fórmula I anterior usadas para la síntesis son compuestos de por sí conocidos y accesibles mediante aplicación de procedimientos de síntesis orgánica conocidos en general.

- 15 En particular la reacción de la etapa a) ocurre en presencia de 1 a 10, 2 a 8 o 3 a 5 equivalentes molares de alcohol alifático por cada mol de cetona de la fórmula I.

- 20 Los alcoholes alifáticos adecuados son en particular mono- o polioles con 1 a 6, en particular 1 a 4 átomos de carbono y 1 a 5, en particular 1 a 3 grupos hidroxilo, en particular monooles con 1 a 4 átomos de carbono, como por ejemplo metanol, etanol, n-propanol, n-butanol; o monooles de cadena larga, como n-pentanol y n-hexanol, o polioles, como propanodiol, butano-1,4-diol, pentano-1,5-diol, hexano-1,6-diol o pentano-1,3,5-triol; y formas isoméricas de estos alcoholes mencionados.

La reacción química en la etapa c) puede ocurrir en particular en solución en un éter de cadena abierta o cíclico. Son éteres adecuados en particular MTBE, metil-THF, dioxano y sobre todo THF.

- 25 La etapa b) de la reacción de acuerdo con la invención es catalizada mediante al menos una enzima, elegida de entre alcoholdehidrogenasas (ADH) (E.C. 1.1.1.1). Al respecto, son las ADHs, elegidas por ejemplo de entre alcoholdehidrogenasas de microorganismos del género *Aromatoleum* (*Azoarcus*), en particular de la bacteria *Aromatoleum Aromaticum* EbN1.

Por ejemplo, la enzima para la ejecución de la etapa b) es elegida de entre enzimas que poseen una secuencia de polipéptidos que es elegida de entre

- 30 (i) SEQ ID NO: 2 o

- (ii) secuencias, en las que hasta 25 %, como por ejemplo 1 a 24 %, 2 a 20 %, 3 a 15 % o 4 a 10 %, de los radicales aminoácido están modificados respecto a SEQ ID NO: 2 mediante adición, eliminación, inserción, sustitución, inversión o una combinación de ellas, y/o que aún exhiben actividad de por lo menos 50 %, como por ejemplo por lo menos 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más de 100 %, como por ejemplo 1 a 20 veces, o 2 a 10 veces o 3 a 5 veces, de la actividad enzimática de una enzima de acuerdo con SEQ ID NO:2.
- 35

De acuerdo con otra modificación, la reacción de la etapa b) ocurre por adición de equivalentes de reducción, en particular NADH o NADPH, y dado el caso bajo regeneración desplazada simultánea o temporal del equivalente de reducción consumido para la reacción.

- 40 Para ello, la regeneración puede ocurrir de manera de por sí conocida por vía enzimática, electroquímica o electroenzimática (Biotechnology Progress, 2005, 21, 1192; Biocatalysis and Biotransformation, 2004, 22, 89; Angew. Chem Int. edición en inglés, 2001, 40, 169; Biotechnol Bioeng, 2006, 96, 18; Biotechnol Adv., 2007, 25, 369; Angew. Chem Int. edición en inglés, 2008, 47, 2275; Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14, 421; Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14, 583). En particular la regeneración ocurre por vía enzimática, y la enzima regenerante es elegida de entre ADH (EC.1.1.1.1) y deshidrogenasas diferentes de ADH, como en particular glucosadeshidrogenasas (EC 1.1.1.47), formiatodeshidrogenasas (EC 1.2.1.2 o EC 1.2.1.43), y
- 45

fosfitodeshidrogenasas (EC 1.20.1.1) y preferiblemente en presencia de un denominado "alcohol de sacrificio", como por ejemplo butano- o pentano-2-ol, el cual es consumido en la regeneración enzimática del equivalente de reducción, es decir es oxidado.

5 En particular la reacción de la etapa b) puede ocurrir sea en presencia de un microorganismo el cual expresa de manera natural o recombinante la ADH, o en presencia de una fracción derivada de ella que contiene ADH, es decir obtenida de las células, o extracto celular obtenido de las células, o en presencia de la enzima pura o esencialmente pura. La enzima usada de acuerdo con la invención (en forma pura, en forma enriquecida, o como extracto celular que contiene la enzima) es usada además de manera de por sí conocida, disuelta, dispersa o inmovilizada en un soporte.

10 Por ejemplo, la reacción de la etapa b) ocurre en presencia de un microorganismo que es elegido de entre bacterias de las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Rhizobiaceae, Lactobacillaceae, Streptomycetaceae, Rhodococcaceae, Rhodocyclaceae y Nocardiaceae, o en presencia de una fracción o un extracto derivado de ellas. Los ejemplos de géneros adecuados comprenden en particular Escherichia, Streptomyces, Corynebacterium y Bacillus. Es ejemplo de un tipo adecuado en particular E. coli.

15 En particular el microorganismo puede ser un microorganismo recombinante, que es transformado con un fragmento de ácidos nucleicos, el cual codifica para una ADH de acuerdo con la definición anterior. Dado el caso, el microorganismo recombinante usado puede expresar adicionalmente una deshidrogenasa exógena o endógena diferente de ADH de acuerdo con la definición anterior, para promover la regeneración del cofactor.

20 En otra modificación, la reacción de la etapa b) puede ser ejecutada en un medio de reacción líquido de dos fases. Para ello se usa por ejemplo un medio de reacción acuoso-orgánico, en el que tanto el reactivo de la fórmula II como también el producto de la fórmula III se disuelven mejor en la fase orgánica que en la fase acuosa, como por ejemplo una fase acuosa-etérea, o por ejemplo fases agua/heptano y agua/hexano.

Otro objetivo descrito aquí se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula general II,



en la que Cyc y Hal poseen los significados indicados anteriormente,

en el que se halogena, en particular se clora, una cetona de la fórmula I



en la que Cyc posee los significados indicados anteriormente,

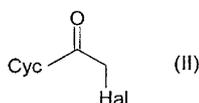
30 en particular en presencia de un alcohol alifático, con un agente adecuado de halogenación, como en particular cloruro de sulfurilo, hasta el compuesto de la fórmula II halogenado, en particular clorado.

Al respecto, la reacción de la etapa a) ocurre en particular en presencia de 1 a 10, como por ejemplo 2 a 8 o 3 a 5, equivalentes molares de alcohol por cada mol de cetona de la fórmula I.

Otro objetivo descrito aquí se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula III



en la que Cyc y Hal poseen los significados indicados anteriormente; en el que un compuesto de la fórmula general II



en la que Cyc y Hal poseen los significados indicados anteriormente, es reducido por vía enzimática hasta el alcohol

de la fórmula III. Al respecto, se conduce la reacción enzimática como se definió anteriormente.

De acuerdo con la invención, Cyc representa en particular un anillo aromático mononuclear, carbocíclico o heterocíclico de 4, 5 o 6 miembros, el cual porta al menos un grupo HO, como en particular un radical 3-hidroxifenilo. Hal representa en particular un átomo de cloro.

- 5 Otro objetivo de la invención se refiere al uso de una alcoholdehidrogenasa de acuerdo con la definición anterior o un microorganismo que produce esta enzima de acuerdo con la definición anterior, para la preparación de compuestos de la fórmula IV, en particular para la preparación de (3-[(1R)-1-hidroxi-2-metilamino-etil]-fenol).

2. Definiciones

2.1 Conceptos generales

- 10 Si no se dan otros datos, entonces son válidos los siguientes significados generales:

"Ópticamente activos" son compuestos de acuerdo con la invención con por lo menos un centro de asimetría en la molécula.

Un "grupo hidroxilo libre" significa de acuerdo con la invención que este no está presente en forma de derivado, como por ejemplo como grupo éster o éter.

- 15 Se entiende por productos de estereoisómero puro o enantiómero puro, como (3-[(1R)-1-hidroxi-2-metilaminoetil]-fenol o (R)-3-(2-cloro-1-hidroxietil)-fenol, los enantiómeros de acuerdo con la invención que muestran un enriquecimiento en enantiómero. En particular en el procedimiento de acuerdo con la invención se alcanzan purezas de enantiómero de por lo menos 90 %ee, preferiblemente de por lo menos 95 %ee, de modo particular preferiblemente de por lo menos 98 %ee, de modo muy particular preferiblemente por lo menos 99 %ee o más.

- 20 La "pureza de enantiómero" es definida mediante los parámetros

$$ee\% = [X_A - X_B] / [X_A + X_B] * 100,$$

en la que X_A y X_B representan la fracción molar de los enantiómeros A o B.

Una reacción ocurre "por vía enzimática" sea en presencia de enzimas puras, enzimas enriquecidas o células completas.

- 25 2.2 Significados químicos especiales

Radicales "mono o polinucleares" son radicales que comprenden uno o varios grupos cíclicos, en los que en el caso de radicales polinucleares estos grupos cíclicos pueden estar unidos mutuamente de manera directa o mediante grupos puente corrientes o mutuamente condensados.

- 30 Radicales "carbocíclicos" comprenden exclusivamente átomos de carbono en el anillo; radicales "heterocíclicos" comprenden además uno o varios, como por ejemplo 1, 2 o 3, heteroátomos de anillo iguales o diferentes, como N, O o S.

- 35 Estos anillos carbo- o heterocíclicos comprenden en particular 3 a 12, preferiblemente 4, 5 o 6 átomos de carbono en el anillo. Como ejemplos pueden mencionarse ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, los análogos de ellos insaturados una o varias veces, como ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclohexadienilo, cicloheptadienilo; así como radicales heterocíclicos con 5 a 7 miembros, saturados o con una o varias insaturaciones, con 1 a 4 heteroátomos que son elegidos de entre O, N y S, en los que el heterociclo dado el caso puede estar condensado con otro heterociclo o carbociclo. En particular se mencionan como radicales heterocíclicos, derivados de pirrolidina, tetrahidrofurano, piperidina, morfolina, pirrol, furano, tiofeno, pirazol, imidazol, oxazol, tiazol, piridina, pirano, pirimidina, piridazina, pirazina, cumarona, indol y quinolina.

- 40 Son ejemplos no limitantes de "sustituyentes" adecuados, los elegidos de entre halógeno, OH, -SH, -NO₂, alquilo pequeño, alquenilo pequeño, alcoxi pequeño y arilo.

"Halógeno" representa flúor, cloro, bromo o yodo, en particular flúor, bromo o cloro.

- 45 "Alquilo pequeño" representa radicales alquilo de cadena recta o ramificada con 1 a 6 átomos de C, como metilo, etilo, i- o n-propilo, n-, i-, sec.- o tert.-butilo, n-pentilo o 2-metilobutilo, n-hexilo, 2-metil-pentilo, 3-metil-pentilo, 2-etil-butilo.

"Alquenilo pequeño" representa los análogos de los radicales alquilo mencionados anteriormente, insaturados una o varias veces, preferiblemente insaturados una o dos veces con 2 a 6 átomos de carbono, en los que el enlace doble

puede estar en cualquier posición de la cadena de carbono.

"Alcoxi pequeño" representa los análogos terminados en oxígeno, de los radicales alquilo anteriores.

"Ariilo" representa un radical aromático mono o polinuclear, preferiblemente mono o binuclear, dado el caso sustituido, en particular representa fenilo o representa un naftilo unido en cualquier posición del anillo, como 1- o 2-naftilo. Estos radicales ariilo pueden portar dado el caso 1 o 2 sustituyentes iguales o diferentes, elegidos de entre halógeno, alquilo pequeño, alcoxi pequeño de acuerdo con la definición anterior, o trifluorometilo.

Son ejemplos de radicales Cyc adecuados fenilo, naftilo, 2-tienilo, 3-tienilo; 2-furanilo, 3-furanilo; 2-piridilo, 3-piridilo o 4-piridilo; 2-tiazolilo, 4-tiazolilo o 5-tiazolilo; 4-metil-2-tienilo, 3-etil-2-tienilo, 2-metil-3-tienilo, 4-propil-3-tienilo, 5-n-butil-2-tienilo, 4-metil-3-tienilo, 3-metil-2-tienilo; 3-cloro-2-tienilo, 4-bromo-3-tienilo, 2-yodo-3-tienilo, 5-yodo-3-tienilo, 4-flúor-2-tienilo, 2-bromo-3-tienilo, y 4-cloro-2-tienilo, los cuales portan adicionalmente al menos un sustituyente hidroxilo en el anillo.

3. Modificaciones especiales del procedimiento de acuerdo con la invención

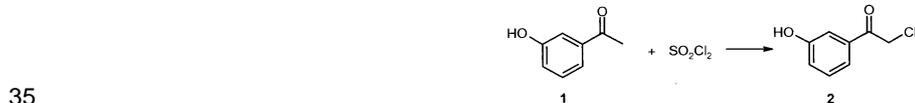
A continuación se explican otros acondicionamientos de la invención, mediante referencia a la reacción de varias etapas representada en el anterior esquema 1. Partiendo de ella están las modificaciones de este procedimiento descrito concretamente en el ámbito de la capacidad humana.

3.1 Cloración selectiva de cadena lateral de 3'-hidroxiacetofenona

El uso principal de cloruro de sulfurilo para la cloración en α de cetonas es de por sí conocido y se describe por ejemplo en D.P. Wyman et al., J. Org. Chem. Vol. 29, 1964, páginas 1956 a 1960.

US 4,310,702 y D. Masilamani et al., J. Org. Chem., Vol. 46, 1981, páginas 4486 a 4489 reportan que el uso de cloruro de sulfurilo para la cloración de cetonas conduce en general a una mezcla de cetonas cloradas una y varias veces y con ello a productos secundarios indeseados. Para resolver el problema, los documentos enseñan el uso de alcoholes o éteres como moderadores. Además, esta publicación enseña la reacción de fenol con cloruro de sulfurilo que conduce primero al correspondiente éster de ácido sulfónico y a continuación a diferentes clorofenoles. También el documento US 5,710,341, que se refiere a la preparación de α -cloroalquilarilcetonas mediante cloración de la correspondiente cetona con cloruro de sulfurilo, enseña el uso de alcoholes alifáticos para aumentar la selectividad hasta el producto deseado, por consiguiente a la cetona clorada una vez en α .

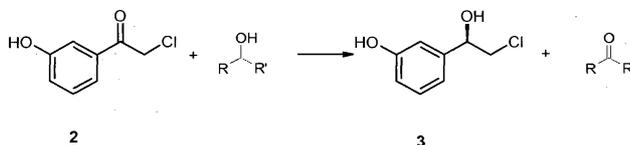
Se encontró ahora de manera sorprendente que bajo las condiciones enseñadas en el documento US 5,710,341 de la reacción de la 3-hidroxiacetofenona que va a ser usada de manera ventajosa para la síntesis de fenilefrina, una cloración conduce casi exclusivamente a las correspondientes α -cloroalquilarilcetonas. Al respecto, para la modulación de la selectividad se añaden a la reacción 1-10 equivalentes de un alcohol (C_1-C_{10}), de modo particularmente preferido se usan entre 3 y 5 equivalentes del alcohol. Además, la reacción es ejecutada en un solvente inerte bajo las condiciones de reacción como por ejemplo compuestos aromáticos, éteres, ésteres y solventes halogenados, que no son miscibles en agua. Se prefiere la realización en ésteres y solventes halogenados, de modo particular preferiblemente en etilacetato o diclorometano.



Esta circunstancia es sorprendente para el experto, puesto que una transformación de la funcionalidad fenólica presente en la molécula, de manera análoga a la forma enseñada por D. Masilamani permite una formación de los correspondientes clorofenoles esperados. Al respecto, la transformación puede ser ejecutada de manera conveniente sin el uso de un grupo protector.

3.2. Hidrogenación enantioselectiva de 3'-hidroxi-2-cloroacetofenona

La reducción de 2 es catalizada mediante una enzima. Es la alcoholdehidrogenasa EbN1 de (*Azoarcus* sp.) *Aromatoleum aromaticum* EbN1, que en el caso especial es preparada de manera recombinante en *Escherichia coli*.



Se sabe que las deshidrogenasas son adecuadas como biocatalizadores para la preparación de compuestos hidroxí ópticamente activos. Son biocatalizadores bien caracterizados, que ya son usados en una serie de procesos técnicos (Angew. Chem. Int. Ed., 2004, 43, 788; Tetrahedron, 2004, 60, 633; Chiral catalysis - asymmetric hydrogenation supplement to Chemistry Today, 2004, 22, 26; Current Opinion in Chemical Biology, 2004, 8, 120; Organic Process Research & Development, 2002, 6, 558; Tetrahedron: Asymmetry, 2003, 14, 2659; Chiral catalysis - asymmetric hydrogenation supplement to Chemistry Today, 2004, 22, 43).

Las deshidrogenasas transforman cetonas o aldehídos en los correspondientes alcoholes secundarios o primarios; en principio, la reacción es reversible. Catalizan la transferencia enantioselectiva de hidruro al átomo C proquiral del compuesto carbonílico.

Los iones hidruro se de los denominados cofactores como por ejemplo NADPH o NADH (nicotinamida-adeninucleotidofosfato reducido o nicotinamida-adeninucleotido reducido). Puesto que son compuestos muy costosos, son añadidos a la reacción sólo en cantidades catalíticas. Los cofactores reducidos son regenerados durante la reacción mediante una segunda reacción redox que tiene lugar de manera simultánea. Dependiendo de las condiciones termodinámicas y cinéticas de la totalidad de la reacción, pueden existir alcoholes secundarios baratos (denominados "alcoholes de sacrificio") como por ejemplo i-propanol como donante final de hidruros de la reacción, como es conocido a partir de la reacción de Meerwein-Ponndorf-Verley. Frecuentemente pueden ejecutarse reducción de cetona y oxidación de alcohol de sacrificio del mismo biocatalizador (acoplamiento de sustrato).

De modo alternativo puede usarse un segundo catalizador, para regenerar los cofactores consumidos. Son ejemplos conocidos de ello las formiato-deshidrogenasa, glucosadeshidrogenasa o fosfitodeshidrogenasa, que a partir de la oxidación de formiato, glucosa o fosfito transfieren iones hidruro de NAD o NADP. (Biocatalysis and Biotransformation, 2004, 22, 89; Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 48, 699; Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1998, 62, 167; Methods Enzymol., 1987, 136, 9; Ann. N. Y. Acad. Sci., 1984, 434, 91; FEBS Journal, 2005, 272, 3816; Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61, 133).

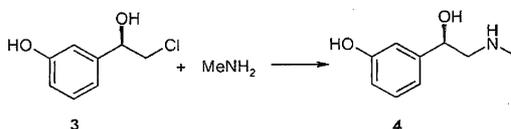
Los equivalentes de reducción de la reacción aquí considerada provienen bien sea de i-propanol (u otro secundario denominado "alcohol de sacrificio") que es oxidado hasta cetona, o de glucosa, que en una reacción paralela es oxidado hasta gluconolactona. Mientras es posible la oxidación de muchos alcoholes de sacrificio por la misma enzima, que ejecuta también la reducción de 2 a R-3, para la oxidación de glucosa tiene que alimentarse glucosadeshidrogenasa como segunda enzima.

De modo alternativo, en lugar de la glucosadeshidrogenasa puede usarse también otro sistema de regeneración, como por ejemplo la fosfito-deshidrogenasa (Biotechnol Bioeng, 2006, 96, 18) o una regeneración electroquímica de cofactor (Angew. Chem Int. Ed Engl., 2001, 40, 169), (Angewandte Chemie Int. Ed. Engl., 1999, 29, 388).

Los biocatalizadores adecuados para la preparación de R-3 son ya descritos en los siguientes documentos de patente de la compañía BASF SE: (DE 2004022686, EP 2005004872, WO 2005108590) o (EP 06123814, WO2008055988 A3).

3.3 Preparación de L-fenilefrina

La terminación de este procedimiento novedoso para la preparación de L-fenilefrina y sus sales forma la reacción del componente 3, obtenido después de la reducción, con metilamina hasta dar el producto deseado.



Esto tiene éxito en muchos solventes diferentes inertes bajo las condiciones de reacción, como por ejemplo agua, alcoholes o éteres. Al respecto de modo particular se prefieren los éteres en los cuales el material 3 de partida se disuelve en una elevada proporción, para poder trabajar en concentraciones razonablemente económicas. Para ello, de modo particularmente preferido aquí se usa THF. Después de la reacción, puede obtenerse L-fenilefrina como base y en forma de sus sales, por ejemplo pero no exclusivamente de acuerdo con el procedimiento enseñado en el documento WO 00/43345.

4. Otros acondicionamientos de la invención

4.1 Alcoholdehidrogenasas

La enzima usada es elegida de entre alcoholdehidrogenasas (E.C. 1.1.1.1). De acuerdo con la invención, es

elegida de entre alcoholdehidrogenasas (E.C. 1.1.1.1).

Sin estar limitados por ello, están disponibles preferiblemente aquellas enzimas de microorganismos de los géneros *Aromatoleum* (algunas veces denominado también como *Azoarcus*), como por ejemplo *Aromatoleum aromaticum*, en particular cepa EbN1.

- 5 Las enzimas preferidas con actividad de ADH comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con la invención se incluyen así mismo "equivalentes funcionales" de las ADHs divulgadas concretamente y el uso de estas en el procedimiento de acuerdo con la invención.

- 10 En el marco de la presente invención "los equivalentes funcionales" o análogos de las enzimas divulgadas concretamente son polipéptidos diferentes de ellas, que además poseen la actividad biológica deseada, como por ejemplo especificidad de sustrato. De este modo, por ejemplo bajo "equivalentes funcionales" se entienden enzimas que reducen 3'-hidroxi-2-cloroacetofenona 2 hasta el correspondiente alcohol R, (R)-3-(2-cloro-1-hidroxietil) fenol 3 y que exhiben por lo menos 50 %, de modo particular preferiblemente 75 %, de modo muy particular preferiblemente 90 % de la actividad de una enzima que comprende una de las secuencias de aminoácidos citada
15 bajo SEQ ID NO:2.

- 20 De acuerdo con la invención, se entienden bajo "equivalentes funcionales" en particular también mutantes que en al menos una posición de secuencia de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente, exhiben otro aminoácido diferente al mencionado concretamente, pero a pesar de ello poseen una de las actividades biológicas mencionadas anteriormente. Los "equivalentes funcionales" comprenden con ello los mutantes obtenibles mediante una o varias adiciones, sustituciones, eliminaciones y/o inversiones de aminoácidos, en las que las modificaciones mencionadas pueden ocurrir en cualquier posición de secuencia, en tanto conduzcan a un mutante con el perfil de propiedades de acuerdo con la invención. En particular se da también la equivalencia funcional, cuando coincide de modo cualitativo el patrón de reactividad entre mutante y polipéptido no modificado, es decir por ejemplo los mismos sustratos son transformados con diferente velocidad.

- 25 En el sentido anterior los "equivalentes funcionales" son también "precursores" de los polipéptido descritos así como "derivados funcionales" y "sales" de los polipéptidos.

"Precursores" son al respecto precursores naturales o sintéticos de los polipéptidos con la actividad biológica deseada. Así mismo se describen precursores sintéticos o naturales de los polipéptidos sin la actividad biológica deseada.

- 30 Bajo la expresión "sales" se entienden tanto sales de grupos carboxilo como también sales de adición ácida de grupos amino de las moléculas de proteína de acuerdo con la invención. Las sales de grupos carboxilo pueden ser preparadas de manera de por sí conocida y comprenden sales inorgánicas, como por ejemplo sales de sodio, calcio, amonio, hierro y zinc, así como sales con bases orgánicas, como por ejemplo aminas, como trietanolamina, arginina, lisina, piperidina y similares. Así mismo están comprendidas en la invención las sales de adición ácida,
35 como por ejemplo sales con ácidos minerales, como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos, como ácido acético y ácido oxálico.

- 40 Así mismo, pueden prepararse "derivados funcionales" de polipéptidos de acuerdo con la invención en grupos funcionales laterales de aminoácidos o en sus extremos terminales en N o C con ayuda de técnicas conocidas. Tales derivados comprenden por ejemplo ésteres alifáticos de grupos ácido carboxílico, amidas de grupos ácido carboxílico, obtenibles mediante reacción con amoníaco o una amina primaria o secundaria; derivados de N-acilo de grupos amino libres, preparados mediante reacción con grupos acilo; o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres, preparados mediante reacción con grupos acilo.

- 45 Los "equivalentes funcionales" comprenden naturalmente también polipéptidos que son accesibles a partir de otros organismos, así como de variantes de origen natural. Por ejemplo, mediante comparación de secuencias se establecen intervalos de regiones de secuencias homólogas y siguiendo los procedimientos concretos de la invención se determinan enzimas equivalentes.

Los "equivalentes funcionales" comprenden así mismo fragmentos, preferiblemente dominios o motivos de secuencia individuales de los polipéptidos de acuerdo con la invención, los cuales exhiben por ejemplo la función biológica deseada.

- 50 Los "equivalentes funcionales" son además proteínas de fusión que exhiben una de las secuencias de polipéptidos mencionadas anteriormente o equivalentes funcionales derivados de ellas y al menos otra secuencia heteróloga diferente funcionalmente de ellos, en unión funcional terminal en N o C (es decir, sin perjuicio funcional mutuo esencial de la zona de perfil de fusión). Son ejemplos no limitantes de tales secuencias por ejemplo péptidos de

señal o enzimas.

De acuerdo con la invención, los "equivalentes funcionales" incluidos son los homólogos a las proteínas divulgadas específicamente. Estas poseen al menos 75% en particular al menos 85 %, como por ejemplo 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%, de homología frente a una de las secuencias de aminoácidos divulgadas específicamente.

5 Una homología porcentual de un polipéptido homólogo de acuerdo con la invención significa en particular identidad porcentual de los radicales aminoácido, referida a la longitud total de una de las secuencias de aminoácidos descrita específicamente aquí.

Se entiende por "identidad" entre dos secuencias en particular la identidad de los radicales sobre la longitud total de secuencia en cada caso, en particular la identidad que es calculada mediante comparación con ayuda del Vector NTI Suite 7.1 (Vector NTI Advance 10.3.0, Invitrogen Corp.) (o software de la compañía Informax (USA) usando el método Clustal (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. abril de 1989; 5(2):151-1), mediante ajuste de los siguientes parámetros:

Parámetros de alineación múltiple:

| | | |
|----|---|---------|
| | Penalidad por apertura de brecha | 10 |
| 15 | Penalidad por extensión de brecha | 0,05 |
| | Intervalo de penalidad por separación de brecha | 8 |
| | Penalidad de separación de brecha | apagado |
| | % de identidad por retardo de alineación | 40 |
| | Brechas específicas de residuo | apagado |
| 20 | Brecha de residuo hidrofílico | apagado |
| | Peso de la transición | 0 |

Parámetros de alineación pareada:

| | | |
|----|------------------------------|---------|
| | Algoritmo FAST | apagado |
| | Tamaño K-tuple | 1 |
| 25 | Penalidad de brecha | 3 |
| | Tamaño de ventana | 5 |
| | Número de mejores diagonales | 5 |

En el caso de una posible glicosilación de proteína, los "equivalentes funcionales" de acuerdo con la invención comprenden proteínas del tipo denominado anteriormente en forma desglucosilada o glicosilada, así como formas modificadas obtenibles mediante cambios del patrón de glicosilación.

Pueden generarse homólogos de las proteínas o polipéptidos de acuerdo con la invención, mediante mutagénesis, por ejemplo mediante mutación puntual o acortamiento de la proteína.

Los homólogos de las proteínas de acuerdo con la invención pueden ser identificados mediante discriminación de bancos combinatorios de mutantes, como por ejemplo mutantes de acortamiento. Por ejemplo pueden generarse un banco variopinto de variantes de proteína mediante mutagénesis combinatoria sobre el plano de ácido nucleico, como por ejemplo mediante unión enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos. Existe una multiplicidad de procedimientos, que pueden ser usados para la preparación de bancos de homólogos potenciales a partir de una secuencia degenerada de oligonucleótido. La síntesis química de una secuencia degenerada de gen puede ser ejecutada en un equipo de síntesis de ADN, y el gen sintético puede entonces unirse en un vector adecuado de expresión. El uso de una frase degenerada de gen hace posible el suministro de secuencias completas en una mezcla, que codifica la frase deseada en secuencias potenciales de proteína. Los procedimientos para la síntesis de oligonucleótidos degenerados son conocidos por los expertos (por ejemplo Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

45 En el estado de la técnica se conocen varias técnicas para discriminar productos de gen de bancos combinatorios, que fueron preparados mediante mutaciones puntuales o acortamiento, y para discriminar bancos de cADN en

productos de gen con una propiedad elegida. Estas técnicas se ajustan a la rápida discriminación de los bancos de gen que han sido generados mediante mutagénesis combinatoria de homólogos de acuerdo con la invención. Las técnicas usadas más frecuentemente para discriminar grandes bancos de gen, que subyacen un análisis con elevado desempeño, comprenden la clonación de bancos de gen en vectores replicables de expresión, transformación de las células adecuadas con el banco de vectores resultante y expresión de los genes combinatorios bajo condiciones bajo las cuales la detección de la actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen, cuyo producto fue detectado. La *Recursive-Ensemble-Mutagenese* (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en los bancos, puede ser usada en combinación con las pruebas de discriminación, para identificar homólogos (Arkin y Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

4.2 Secuencias de ácido nucleico que codifican

En el contexto de la invención, los conceptos "expresar" o "sobreexpresión" describen la producción o aumento de la actividad intracelular de una o varias enzimas en un microorganismo, que son codificadas por el correspondiente ADN. Para ello puede por ejemplo incorporarse un gen en un organismo, reemplazar un gen presente por otro gen, el cual aumenta el número de copias del gen o de los genes, usar un promotor fuerte o usar un gen que codifica para una enzima correspondiente con una actividad elevada y pueden combinarse dado el caso estas medidas.

Aquí se describen en particular secuencias de ácidos nucleicos que codifican para una enzima con actividad de ADH. Se prefieren secuencias de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:1; o secuencias de ácidos nucleicos derivadas de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO.: 2.

Todas las secuencias de ácidos nucleicos mencionadas aquí (secuencias de ADN y ARN de cuerda individual o doble, como por ejemplo cADN y mARN) pueden ser preparadas de manera de por sí conocida mediante síntesis química a partir de los elementos de nucleótido, como por ejemplo mediante condensación de fragmento de elementos de la hélice doble de ácido nucleico individuales que se traslapan, complementarios. La síntesis química de oligonucleótidos puede ocurrir por ejemplo de manera conocida, de acuerdo con el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press Nueva York, páginas 896-897). En Sambrook et al. (1989), molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, se describen la adición de oligonucleótidos sintéticos y el llenado de vacíos con ayuda del fragmento de Klenow de las reacciones de ADN-polimerasa de unión así como procedimientos generales de clonación.

Se describen aquí también secuencias de ácidos nucleicos (secuencias de cuerda individual y cuerda doble de ADN y ARN, como por ejemplo cADN y mARN), que codifican para uno de los polipéptidos anteriores y sus equivalentes funcionales, los cuales por ejemplo son accesibles por ejemplo mediante uso de análogos artificiales de nucleótido.

Se describen tanto moléculas aisladas de ácido nucleico, que codifican para polipéptidos o proteínas o cortes de ellos biológicamente activos, como también fragmentos de ácido nucleico, que pueden ser utilizados por ejemplo para el uso como sondas de hibridación o cebadores para la identificación o amplificación de ácidos nucleicos que codifican.

Las moléculas de ácido nucleico pueden contener además secuencias no traducidas del extremo 3' y/o 5' del intervalo de gen que codifica.

Se describen también las moléculas de ácido nucleico complementarias a las secuencias de nucleótido descritas específicamente, o un corte de ellas.

Las secuencias de nucleótido descritas aquí hacen posible la generación de sondas y cebadores, que pueden ser utilizadas para la identificación y/o clonación de secuencias homólogas en otros tipos de células y organismos. Tales sondas o cebadores comprenden usualmente un intervalo de secuencia de nucleótido, que bajo condiciones "rigurosas" (véase abajo) hacen hibridación en por lo menos aproximadamente 12, preferiblemente por lo menos aproximadamente 25, como por ejemplo aproximadamente 40, 50 o 75 nucleótidos consecutivos de una cuerda en sentido de una secuencia de ácidos nucleicos descrita aquí, o una correspondiente cuerda antisentido.

Una molécula "aislada" de ácido nucleico está separada de otras moléculas de ácido nucleico, que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico y puede además estar esencialmente libre de otro material celular o medio de cultivo, cuando es preparada mediante técnicas recombinantes, o estar libre de precursores químicos u otras sustancias químicas, cuando es sintetizada por vía química.

Una molécula de ácido nucleico descrita aquí puede ser aislada por medio de técnicas estándar de biología molecular y de la información de secuencia suministrada de acuerdo con la invención. Por ejemplo puede aislarse cADN de un banco adecuado de cADN, en lo cual se usa una de las secuencias completas divulgadas específicamente o un corte de ella como sonda de hibridación, y técnicas estándar de hibridación (como se

describe por ejemplo en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. *molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Además, se aísla una molécula de ácido nucleico que comprende una de las secuencias divulgadas o un corte de ella, mediante reacción de cadena de polimerasa, en la que se usa el cebador de oligonucleótido que fue preparado a base de esta secuencia. El ácido nucleico así amplificado puede ser clonado en un vector adecuado y ser caracterizado mediante análisis de secuencia de ADN. Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención pueden ser preparados además mediante procedimientos estándar de síntesis, por ejemplo con un aparato automático de síntesis de ADN.

Las secuencias de ácido nucleico descritas aquí, como SEQ ID No: 1 o derivados de ellas, homólogos o partes de estas secuencias, se aíslan por ejemplo con procedimientos corrientes de hibridación o la técnica PCR a partir de microorganismos adecuados, por ejemplo mediante bancos genómicos o de cADN. Estas secuencias de ADN dan hibridación bajo condiciones estándar con las secuencias descritas aquí. Para la hibridación se usan de manera ventajosa oligonucleótidos cortos. Pero para la hibridación pueden usarse también fragmentos más largos de los ácidos nucleicos descritos aquí o las secuencias completas. Dependiendo del ácido nucleico usado (oligonucleótido, fragmento más largo o secuencia completa) o dependiendo de cuál tipo de ácido nucleico ADN o ARN se usa para la hibridación, estas condiciones estándar varían. De este modo, por ejemplo las temperaturas de fusión para híbridos ADN:ADN son inferiores en 10°C que las de híbridos ADN:ARN de la misma longitud.

Se entienden por condiciones estándar, por ejemplo dependiendo del ácido nucleico, temperaturas entre 42 y 58 °C en una solución amortiguadora acuosa con una concentración entre 0,1 a 5 x SSC (1 X SSC = NaCl 0,15 M, citrato de sodio 15 mM, pH 7,2) o adicionalmente en presencia de formamida 50% como por ejemplo 42 °C en 5 x SSC, formamida 50%. De manera ventajosa, las condiciones de hibridación para híbridos ADN:ADN están en 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 20 °C a 45°C, preferiblemente entre aproximadamente 30 °C a 45 °C. Para híbridos ADN:ARN las condiciones de hibridación están ventajosamente en 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 30°C a 55 °C, preferiblemente entre aproximadamente 45 °C a 55 °C. Estas temperaturas indicadas para la hibridación son valores de temperatura de fusión calculados de manera ventajosa para un ácido nucleico con una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos y un contenido de G + C de 50 % en ausencia de formamida. Las condiciones experimentales para la hibridación de ADN son descritas en libros de texto pertinentes de genética, como por ejemplo Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, y se calculan de acuerdo con fórmulas conocidas por los expertos, por ejemplo dependiendo de la longitud del ácido nucleico, el tipo de híbrido o el contenido de G + C. el experto puede tomar otras informaciones para la hibridación de los siguientes libros de texto: Ausubel et al. (eds), 1985, *Current Protocols in molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Hames and Higgins (eds), 1985, *Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, *Essential molecular Biology: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Se describen también aquí derivados de las secuencias de ácido nucleico divulgadas específicamente o derivables.

De este modo otras secuencias de ácido nucleico descritas aquí pueden derivarse por ejemplo de SEQ ID NO:1, y se diferencian de ella por adición, sustitución, inserción o eliminación de uno o varios nucleótidos, pero además codifican para polipéptidos con el perfil deseado de propiedades.

Se describen aquí también aquellas secuencias de ácidos nucleicos que comprenden las denominadas mutaciones mudas o de modo correspondiente al uso del codón de un organismo original o huésped especial, están modificadas en comparación con una secuencia mencionada específicamente, así como variantes de ellas de ocurrencia natural, como por ejemplo variantes de empalme o variantes de alelo.

Se describen así mismo secuencias obtenibles mediante sustituciones de nucleótidos que conservan (es decir reemplazan el aminoácido en cuestión por un aminoácido de la misma carga, tamaño, polaridad y/o solubilidad).

Se describen también aquí las moléculas derivadas mediante polimorfismos de secuencia, de los ácidos nucleicos divulgados específicamente. Estos polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población, debido a la variación natural. Estas variaciones naturales causan comúnmente una varianza de 1 a 5 % en la secuencia de nucleótidos de un gen.

Se entienden por derivados de la secuencia de ácidos nucleicos descrita aquí con la secuencia SEQ ID NO: 1, por ejemplo las variantes de alelo que exhiben por lo menos 40 % de homología sobre el plano derivado del aminoácido, preferiblemente por lo menos 60 % de homología, de modo muy particular preferiblemente por lo menos 80 % de homología sobre la totalidad del ámbito de secuencia (respecto a la homología en el plano de aminoácidos, se remite a las realizaciones anteriores de los polipéptidos). Sobre ámbitos parciales de las secuencias, las homologías pueden ser ventajosamente más altas.

Además, se entienden por derivados también los homólogos de las secuencias de ácidos nucleicos, en particular de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo homólogos fúngicos o bacterianos, secuencias acortadas, ADN o ARN de cuerda

individual de la secuencia de ADN que codifica y que no codifica. De este modo por ejemplo homólogos de la SEQ ID NO: 1 en el plano de ADN poseen una homología de por lo menos 40 %, preferiblemente de por lo menos 60 %, de modo particular preferiblemente de por lo menos 70 %, de modo muy particular preferiblemente de por lo menos 80 % sobre la totalidad del ámbito de ADN indicado en SEQ ID NO: 1.

5 Además, se entienden por derivados por ejemplo fusiones con promotores. Los promotores que anteceden las secuencias indicadas de nucleótido, pueden ser modificados mediante uno o varios reemplazos de nucleótido, inserciones, inversiones y/o eliminaciones, sin que se perjudique la funcionalidad o eficacia del promotor. Además, los promotores pueden elevar su eficacia por modificación de su secuencia, o ser intercambiados completamente por promotores más eficaces también de organismos disímiles.

10 Se entienden por derivados también variantes cuya secuencia de nucleótidos fue modificada en el intervalo de -1 a -1000 bases corriente arriba antes del codón de partida o 0 a 1000 bases corriente abajo después del codón de detención, de modo que cambia, preferiblemente aumenta, la expresión de gen y/o la expresión de proteína.

Además se describen también secuencias de ácidos nucleicos, que hibridan con secuencias que codifican mencionadas anteriormente, bajo "condiciones severas". Estos polinucleótidos son detectados en la exploración de bancos genómicos o bancos de cADN y dado el caso se propagan a partir de ellos con cebadores adecuados por medio de PCR y a continuación se aíslan por ejemplo con sondas adecuadas. Además, pueden sintetizarse también por vía química los polinucleótidos descritos aquí. Se entiende por esta propiedad a la capacidad de un poli u oligonucleótido para unirse bajo condiciones severas a una secuencia casi complementaria, mientras bajo estas condiciones cesan uniones inespecíficas entre asociados no complementarios. Para ello, las secuencias deberían ser complementarias en 70-100%, preferiblemente en 90-100%. La propiedad de las secuencias complementarias de poder unirse mutuamente de manera específica, beneficia por ejemplo en la técnica de la mancha del norte o mancha del sur o en la unión de cebador en PCR o RT-PCR. Comúnmente se usan para ello oligonucleótidos desde una longitud de 30 pares de bases. Se entienden por condiciones severas por ejemplo en la técnica de la mancha del norte, al uso de una solución de lavado caliente a 50 - 70 °C, preferiblemente 60 - 65 °C, por ejemplo amortiguador 0,1x SSC con 0,1% de SDS (20x SSC: NaCl 3M, citrato de sodio 0,3M, pH 7,0) para la elución no específica de sondas híbridas de cADN u oligonucleótidos. Al respecto permanecen unidos mutuamente, como se mencionó anteriormente, sólo ácidos nucleicos complementarios en alta medida. El ajuste de condiciones severas es conocido por los expertos y es descrito por ejemplo en Ausubel et al., Current Protocols in molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6..

30 4.3 Fragmentos usados

Se usan además fragmentos de expresión, que contienen entre los controles genéticos de secuencias reguladoras de ácidos nucleicos, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una enzima de acuerdo con la invención; así como vectores que comprenden al menos uno de estos fragmentos de expresión.

Preferiblemente tales fragmentos comprenden un promotor en 5' corriente arriba de la respectiva secuencia que codifica y en 3' corriente abajo una secuencia de terminación, así como dado el caso otros elementos reguladores corrientes, y concretamente en cada caso unidos de modo operativo con la secuencia que codifica.

Se entiende por una "unión operativa" el arreglo secuencial de promotor, secuencia que codifica, terminador y dado el caso otros elementos reguladores, de modo que cada uno de los elementos reguladores puede satisfacer como se pretende su función en la expresión de la secuencia que codifica. Son ejemplos de secuencias que pueden unirse de modo operativo, las secuencias de objetivo así como potenciadores, señales de poliadenilación y similares. Otros elementos reguladores comprenden marcadores que pueden ser seleccionados, señales de amplificación, fuentes de replicación y similares. Por ejemplo en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) se describen secuencias reguladoras adecuadas.

Se entiende por un fragmento de ácidos nucleicos usado en particular la ADH con secuencia SEQ ID NO: 1 y los derivados y homólogos de ella, así como las secuencias de ácidos nucleicos que pueden derivarse de SEQ ID NO: 1, que estuvieron unidas ventajosamente de modo operativo o funcional con una o varias señales reguladoras para la modulación, por ejemplo elevación, de la expresión de gen.

Adicionalmente a estas secuencias reguladoras, puede estar presente aún la regulación natural de estas secuencias antes de los verdaderos genes estructurales y dado el caso había sido modificada genéticamente, de modo que se deshabilitó la regulación natural y se aumentó la expresión de los genes. El fragmento de ácidos nucleicos puede estar constituido también de manera simple, es decir no se insertó ninguna señal reguladora adicional antes de la secuencia que codifica (como por ejemplo SEQ ID NO: 1 o sus homólogos) y no se eliminó el promotor natural con su regulación. En lugar de ello la secuencia reguladora natural muta de modo que ya no ocurre más regulación y se eleva la expresión del gen.

Un fragmento preferido de ácidos nucleicos contiene de manera ventajosa también una o varias de las secuencias "potenciadoras" ya mencionadas, unidas de manera funcional con el promotor, lo cual hace posible una elevada expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. También en el extremo 3' de las secuencias de ADN pueden insertarse secuencias adicionales ventajosas, como otros elementos reguladores o terminadores. Los ácidos nucleicos descritos aquí pueden estar presentes en una o varias copias en el fragmento. En el fragmento pueden estar presentes aún otros marcadores, como resistencias a los antibióticos o genes que complementan las auxotrofías, dado el caso para la selección en el fragmento.

Las secuencias reguladoras ventajosas para el procedimiento están presentes por ejemplo en promotores como promotores *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *lacI^q* T7, T5, T3, *gal*, *trc*, *ara*, *rhaP* (*rhaP_{BAD}*)SP6, *lambda-P_R* o en el promotor *lambda-P_L*, que encuentran aplicación de manera ventajosa en bacterias gram-negativas. Otras secuencias reguladoras ventajosas están presentes por ejemplo en los promotores gram-positivos *amy* y *SPO2*, en los promotores de levaduras u hongos *ADC1*, *MFalpha*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH*. En esta relación son ventajosos también los promotores de la piruvato Descarboxilasa y la metanol oxidasa, por ejemplo de *Hansenula*. Pueden usarse también promotores artificiales para la regulación.

El fragmento de ácidos nucleicos es insertado para la expresión en un organismo huésped, ventajosamente en un vector como por ejemplo un plásmido o un fago, el cual hace posible una óptima expresión de los genes en el huésped. Se entienden por vectores, aparte de plásmidos y fagos, también todos los otros vectores conocidos por los expertos, por consiguiente por ejemplo virus, como SV40, CMV, baculovirus y adenovirus, transposons, elementos IS, fasmidos, cósmidos, y ADN lineal o circular. Estos vectores pueden replicarse de manera autónoma en el organismo huésped o replicarse de modo cromosomal. Son por ejemplo plásmidos adecuados en *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pKK223-3, pDHE19.2, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹³-B1, gt11 o pBdCl, en *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 o pIJ361, en *Bacillus* pUB110, pC194 o pBD214, en *Corynebacterium* pSA77 o pAJ667, en hongos pALS1, pIL2 o pBB116, en levaduras 2alphaM, pAG-1, YEp6, YEp13 o pEMBLye23 o en plantas pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004 o pDH51. Los plásmidos mencionados representan una pequeña selección de los plásmidos posibles. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos y pueden ser tomados por ejemplo del libro *Cloning Vectors* (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

De manera ventajosa, el fragmento de ácido nucleico contiene para la expresión de los otros genes presentes, adicionalmente aún secuencias reguladoras terminales en 3' y/o 5' para elevar la expresión, las cuales son elegidas dependiendo del organismo huésped seleccionado y gen o genes, para una óptima expresión.

Estas secuencias reguladoras deberían hacer posible la expresión focalizada de los genes y la expresión de proteína. Esto puede significar por ejemplo, dependiendo del organismo huésped, que el gen es expresado o sobreexpresado justo después de la inducción, o que es expresado y/o sobreexpresado de inmediato.

Al respecto, las secuencias o factores reguladores pueden influir positivamente y por ello elevar preferiblemente la expresión del gen de los genes introducidos. De este modo puede ocurrir un refuerzo de los elementos reguladores de manera ventajosa en el plano de transcripción, en el cual se usan señales fuertes de transcripción como promotores y/o "potenciadores". Aparte de ello es posible también un refuerzo de la traducción, en el cual mejora por ejemplo la estabilidad del mRNA.

En otra forma de acondicionamiento del vector, puede introducirse en el microorganismo el vector que contiene el fragmento de ácido nucleico o el ácido nucleico, también de manera ventajosa en forma de un ADN lineal y mediante recombinación heteróloga u homóloga integrarlo en el genoma del organismo huésped. Este ADN lineal puede consistir en un vector transformado en lineal como un plásmido o sólo en el fragmento de ácido nucleico o el ácido nucleico descrito aquí.

Para una expresión óptima de genes heterólogos en organismos, es ventajoso modificar las secuencias de ácidos nucleicos de manera correspondiente al "uso de codón" específico usado en el organismo. El "uso de codón" es determinado fácilmente en virtud de valoraciones por computador de otros genes conocidos del organismo en cuestión.

La preparación de un casete de expresión descrito aquí ocurre mediante fusión de un promotor adecuado con una secuencia de nucleótidos adecuada que codifica, así como una señal de terminación o de poliadenilación. Para ello se usan técnicas establecidas de recombinación y clonación, como se describen por ejemplo en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, *molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) así como en T.J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987).

El fragmento de ácido nucleico recombinante o fragmento de gen es insertado para la expresión en un organismo

huésped adecuado, de manera ventajosa en un sector específico del huésped, el cual hace posible una óptima expresión del gen en el huésped. Los vectores son bien conocidos por los expertos y pueden ser tomados por ejemplo de "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., editor, Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford, 1985).

4.4 Huéspedes convenientes

- 5 Con ayuda de los vectores aquí descritos pueden producirse microorganismos recombinantes, los cuales son transformados por ejemplo con al menos un vector descrito aquí y pueden ser utilizados para la producción de los polipéptidos usados o para la ejecución de la reacción enzimática de acuerdo con la invención.

De manera ventajosa se incorporan y expresan en un sistema huésped adecuado, los fragmentos recombinantes descritos anteriormente. Al respecto se usan preferiblemente métodos de clonación y transfección familiares conocidos por el experto, como por ejemplo coprecipitación, fusión de protoplastos, electroevaporación, transfección retroviral y similares, para llevar a la expresión los ácidos nucleicos mencionados en el respectivo sistema de expresión. Por ejemplo en Current Protocols in molecular Biology, F. Ausubel et al., editor, Wiley Interscience, Nueva York 1997, o Sambrook et al. molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 se describen sistemas adecuados.

Pueden prepararse también microorganismos recombinados homólogos. Para ello se prepara un vector, el cual contiene al menos un corte de un gen descrito aquí o una secuencia que codifica, en la que dado el caso se había incorporado al menos una eliminación, adición o sustitución de aminoácidos, para modificar la secuencia, por ejemplo interrumpirla de modo funcional (vector de "bloqueo genético"). La secuencia incorporada puede ser por ejemplo también un homólogo de un microorganismo pariente o derivarse de una fuente de mamífero, levadura o insecto. El vector usado para la recombinación homóloga puede de modo alternativo ser acondicionado de modo que el gen endógeno muta por recombinación homóloga o es modificado de otro modo, aunque aún codifica la proteína funcional (por ejemplo puede modificarse la zona reguladora ubicada corriente arriba, de modo que es modificada mediante la expresión de la proteína endógena). El corte modificado de gen está en el vector de recombinación homóloga. La construcción de vectores adecuados hasta dar recombinación homóloga es descrita por ejemplo en Thomas, K.R. y Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503.

Como organismos huésped recombinantes para los ácidos nucleicos descritos aquí o el fragmento de ácidos nucleicos, entran en consideración en principio todos los organismos procariontes o eucariotas. De modo ventajoso, se usan como organismos huésped, microorganismos como bacterias, hongos o levaduras. De modo ventajoso se usan bacterias gram-positivas o gram-negativas, preferiblemente bacterias de las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Streptomycetaceae, Bacillaceae o Nocardiaceae, de modo particularmente preferido bacterias de los géneros Escherichia, Pseudomonas, Streptomyces, Nocardia, Burkholderia, Salmonella, Agrobacterium, Bacillus o Rhodococcus. De modo muy particular se prefiere el género y tipo Escherichia coli. Además otras bacterias ventajosas se encuentran en el grupo de las alpha-proteobacterias, beta-proteobacterias o gamma-proteobacterias.

Al respecto, el organismo huésped o los organismos huésped contienen preferiblemente por lo menos uno de los descritos fragmentos de ácidos nucleicos, secuencias de ácidos nucleicos o vectores, que codifican para una enzima ADH.

Los organismos usados en el procedimiento de acuerdo con la invención son cultivados o criados, dependiendo del organismo huésped en forma conocida por el experto. Los microorganismos son cultivados por regla general en un medio líquido que contiene una fuente de carbono usualmente en forma de azúcares, una fuente de nitrógeno usualmente en forma de fuentes de nitrógeno orgánico como extracto de levadura o sales como sulfato de amonio, elementos traza como sales de hierro, manganeso, magnesio, a temperaturas entre 0°C y 100 °C, preferiblemente entre 10 °C a 60 °C bajo exposición a oxígeno gaseoso. Al respecto, puede mantenerse el pH del líquido nutritivo en un valor fijo, es decir ser regulado o no durante la propagación. La propagación puede ocurrir en modo "de lote", en modo de "semilote" o continuamente. Los nutrientes pueden ser colocados previamente al inicio de la fermentación o ser suministrados de manera semicontinua o continua.

La cetona que va a reaccionar puede ser añadida directamente a la propagación o ventajosamente después de la propagación.

- 50 Las enzimas pueden ser aisladas de los organismos o ser usadas como extracto crudo para la reacción.

Los organismos huésped contienen una actividad enzimática por ejemplo de 1 U/l, como por ejemplo actividad de ADH, preferiblemente 100 U/l, de modo particularmente preferido mayor a 1000 U/l.

4.5 Preparación recombinante de enzimas:

Las enzimas usadas son accesibles también mediante preparación recombinante, en la que se cultiva un microorganismo que produce estas enzimas, dado el caso se induce la expresión del polipéptido y se aísla este del cultivo. Los polipéptidos pueden ser producidos también en escala industrial, en caso de desearse.

5 El microorganismo recombinante puede ser cultivado y fermentado de acuerdo con procedimientos conocidos. Las bacterias pueden multiplicarse por ejemplo en medio TB o LB y a una temperatura de 20 a 40°C y un valor de pH de 6 a 9. Por ejemplo en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) se describen en detalle las condiciones adecuadas de cultivo.

10 Se maceran entonces las células, en caso que el polipéptido no esté secretado en el medio de cultivo, y se obtiene el producto de acuerdo con procedimientos conocidos de aislamiento de proteínas, a partir del producto de lisis. A elección, las células pueden ser sometidas a digestión con ultrasonido de alta frecuencia, mediante alta presión, como por ejemplo en una celda francesa de presión, mediante osmólisis, mediante la acción de detergentes, enzimas líticas o solventes orgánicos, mediante homogenizadores o mediante combinación de varios de los procedimientos citados.

15 Puede alcanzarse una purificación de los polipéptido con procedimientos cromatográficos conocidos, como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), como cromatografía en Q-Sepharose, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba, así como con otros procedimientos corrientes como ultrafiltración, cristalización, precipitación por sales, diálisis y electroforesis nativa en gel. 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 se describen procedimientos adecuados.

20 Para el aislamiento de la proteína recombinante, puede ser ventajoso usar sistemas de vectores u oligonucleótidos, que alargan el cADN en determinadas secuencias de nucleótidos y con ello codifican para polipéptidos o proteínas de fusión modificados, que sirven por ejemplo para una purificación más simple. Tales modificaciones adecuadas son por ejemplo denominadas "balizas" que actúan como ancla, como por ejemplo la modificación o epítipo conocida como ancla de hexa-histidina, que pueden ser reconocidas como antígenos de anticuerpos (descritos por ejemplo en Harlow, E. y Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Estas anclas pueden servir para la unión de la proteína a un soporte sólido, como por ejemplo una matriz de polímero, que puede ser empacada por ejemplo en una columna cromatográfica, o puede ser usada en una placa de microtitulación o en otro soporte.

30 Simultáneamente pueden usarse estas anclas también para el reconocimiento de las proteínas. Para el reconocimiento de las proteínas pueden usarse además marcadores corrientes, como colorantes de fluorescencia, marcadores de enzimas, que después de la reacción con un sustrato forman un producto detectable de reacción, o marcadores radioactivos, solos o en combinación con las anclas, para formar el derivado de las proteínas.

4.6 Realización de la etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de alcoholes ópticamente activos

35 Las enzimas utilizadas pueden ser usadas en la etapa del procedimiento de acuerdo con la invención, como enzima libre o inmovilizada.

La etapa del procedimiento de acuerdo con la invención es ejecutada de manera ventajosa a una temperatura entre 0 °C y 60 °C, preferiblemente entre 10 °C y 40 °C, de modo particularmente preferido entre 15 °C y 35 °C.

40 El valor de pH durante la etapa de procedimiento de acuerdo con la invención es mantenido ventajosamente entre pH 4 y 12, preferiblemente entre pH 4,5 y 9, de modo particular preferiblemente entre pH 5 y 8.

45 Para el procedimiento de acuerdo con la invención pueden usarse células en crecimiento, que contienen los ácidos nucleicos, fragmentos de ácidos nucleicos o vectores de acuerdo con la invención. También pueden usarse células en reposo o maceradas. Se entiende por células maceradas por ejemplo las células que mediante un tratamiento con, por ejemplo, solventes han sido convertidas en porosas, o células que fueron rotas mediante un tratamiento enzimático, mediante un tratamiento mecánico (por ejemplo prensa francesa o ultrasonido) o mediante otro método. Los extractos crudos así obtenidos son adecuados para el procedimiento de acuerdo con la invención. También pueden usarse para el procedimiento enzimas purificadas o no purificadas. Así mismo, son adecuados microorganismos o enzimas inmovilizados.

50 Si para el procedimiento de acuerdo con la invención se usan organismos o enzimas libres, entonces estos son separados de manera conveniente antes de la extracción, por ejemplo mediante una filtración o centrifugación.

Si se usa un medio de reacción bifásico (acuoso/orgánico), entonces mediante ello se facilita el aislamiento del producto, puesto que puede disolverse el producto valioso preferiblemente en la fase orgánica. Por ejemplo se usa en particular un solvente esencialmente no miscible en agua, como por ejemplo un éter, para formar el sistema

bifásico.

Si por el contrario en la etapa enzimática del procedimiento se usa un medio de reacción monofásico, entonces se obtiene el producto preparado a partir de la solución acuosa de reacción, mediante extracción o destilación o de manera ventajosa mediante extracción y destilación. Puede repetirse varias veces la extracción para aumentar el rendimiento. Son ejemplos de agentes adecuados de extracción los solventes, como tolueno, cloruro de metileno, acetato de butilo, diisopropiléter, benceno, MTBE o éster acético, sin estar limitados a ellos.

Después de concentrar la fase orgánica, pueden obtenerse los productos por regla general con buenas purezas químicas, es decir con una pureza química mayor a 80 %, 90 %, 95 % o 99 %. Después de la extracción puede concentrarse la fase orgánica con el producto, pero también sólo parcialmente, y separarse por cristalización el producto. Para ello se enfría ventajosamente la solución a una temperatura de 0 °C a 10 °C. La cristalización puede ocurrir también directamente a partir de la solución orgánica o de una solución acuosa. El producto separado por cristalización puede ser recogido una vez más en el mismo o en otro solvente, para una nueva cristalización, y ser cristalizado una vez más. Mediante la subsiguiente cristalización ventajosa ejecutada por lo menos una vez puede elevarse más la pureza de enantiómero del producto, en caso de ser necesario.

En los tipos de procesamiento mencionados se aísla el producto del procedimiento de acuerdo con la invención con rendimientos de 60 a 100 %, preferiblemente de 80 a 100 %, de modo particularmente preferido de 90 a 100 %, referido al sustrato usado para la reacción. El producto aislado se distingue por una elevada pureza química de > 90 %, preferiblemente > 95 % de modo particularmente preferido de > 98 %. Además, los productos tienen una elevada pureza de enantiómero que, en caso de ser necesario, puede ser elevada adicionalmente de manera ventajosa mediante la cristalización.

El procedimiento de acuerdo con la invención puede ser operado en modo de lote, modo de semilote o continuamente.

La ejecución del procedimiento puede ocurrir de manera ventajosa en biorreactores, como se describe por ejemplo en Biotechnology, volumen 3, 2ª edición, Rehm et al editor, (1993) en particular capítulo II.

La descripción anterior y los ejemplos siguientes sirven sólo para aclarar la invención. Así mismo son posibles las numerosas modificaciones posibles evidentes para el experto.

Parte experimental:

Ejemplo 1: síntesis de HCAP, 2 (en etilacetato):

En un reactor de miniplanta de 6000 ml con impulsor agitador, deflector de flujo, termómetro y embudo de goteo se colocan previamente 435,68g (3,20 mol) de 3-hidroxiacetofenona en 410,11g (12,80 mol) de metanol y 1200 ml de etilacetato. A esta solución se añaden gota a gota a 20 - 30°C bajo enfriamiento 691,05g (5,12 mol) de cloruro de sulfurilo en un periodo de 2h. Después de la adición por goteo se agita la carga por una hora adicional a temperatura ambiente. Después de ello se hidroliza la carga a temperatura ambiente con 1600 ml de H₂O y se separa la mezcla bifásica resultante. Se realiza extracción a la fase acuosa por una vez con 800 ml de etilacetato. De las fases orgánicas combinadas se separan por destilación el metanol y el etilacetato mediante un puente de destilación. Simultáneamente se añaden al fondo de la destilación gota a gota 1880 ml de isopropanol. Se obtienen 2462,5g de una solución al 17,3% en isopropanol, del producto valioso lo cual corresponde a un contenido de 426 g (2,51 mol). Con ello, el rendimiento es de 78%.

Ejemplo 2: síntesis de HCAP, 2 (en diclorometano):

En un reactor de miniplanta de 2000 ml con impulsor agitador, deflector de flujo, termómetro y embudo de goteo se colocan previamente 204,23g (1,50 mol) de 3-hidroxiacetofenona en 192,24g (6,00 mol) de metanol y 1050ml de CH₂Cl₂. A esta solución se añaden gota a gota a 20 - 30°C bajo enfriamiento 283,44g (2,10 mol) de cloruro de sulfurilo en un periodo de 2 horas. Después de la adición por goteo, se agita la carga por una hora adicional a temperatura ambiente.

Después de ello se hidroliza la carga a temperatura ambiente con 400 ml de H₂O y se separa la mezcla bifásica resultante. Después de la separación de fases, se separa por destilación a presión normal de la fase orgánica, el metanol y el CH₂Cl₂ mediante un puente de destilación. Simultáneamente se añaden gota a gota con la misma velocidad 880ml de isopropanol. Se obtienen 837,78g de una solución al 25,7% en isopropanol del producto valioso, lo cual corresponde a un contenido de 215 g (1,26 mol). Con ello, el rendimiento fue de 84%.

Ejemplo 3: síntesis de HCPE, 3:

Se reduce una cetona 2 preparada como en el Ejemplo 1 o 2, por vía biocatalítica hasta R-3. Para ello se disuelven

- en un recipiente con agitación adecuado en 1,44 L de amortiguador acuoso de fosfato de potasio (50mM, pH 7) MgCl₂ 1mM, 0,02 mM nicotinamidadenindinucleótido (NAD) y 282g de i-propanol, el cual sirve también como alcohol de sacrificio para la regeneración del cofactor. Como catalizador se usan células de *Escherichia coli* recombinante (correspondientes a 3,75 g de biomasa seca), la cual sobreproduce una deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.1) estereoselectiva. La preparación de un biocatalizador adecuado es descrita en el documento WO 2005/108590, Ejemplos 1-3, sobre el cual se hace aquí expresa referencia. Se cubre la fase acuosa con 1,3 kg de MtBE. Se dosifican a la mezcla de reacción 292,8 g de 2 (como solución en isopropanol). En la carga de reacción, la concentración de 2 no debería superar 50mM. Puede hacerse seguimiento a la reacción por medio de cromatografía quiral o aquiral.
- 10 Después de la reacción se separan la fase orgánica y acuosa, debido a sus diferentes densidades específicas. Éxito que recuerda el producto valioso R-3 se encuentra particularmente en la fase de MtBE.

Ejemplo 4: síntesis de fenilefrina, 4:

- Se disuelven 15 g (86,9 mmol) del compuesto R-3 en 85 ml THF y se hacen reaccionar en el autoclave a presión a 90°C con 13,5 g (435 mmol) de metilamina. Se deja reaccionar por el tiempo necesario hasta que el reactivo se ha transformado completamente (aproximadamente 5 horas). A continuación se enfría a temperatura ambiente y se concentra la suspensión obtenida. Mediante adición de 100g de agua se precipita la base libre del producto valioso y se aísla. Se obtienen 12,85 g (76,8 mmol, 88%) de base libre de fenilefrina.

Listado de secuencias

- <110> BASF SE
- 20 <120> procedimiento para la preparación de alcoholes ópticamente activos
- <130> M/49024-PCT
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 25 <211> 750
- <212> ADN
- <213> Aromatoleum aromaticum EbN1
- <220>
- <221> CDS
- 30 <222> (1)..(750)
- <400> 1

ES 2 663 272 T3

atg acg caa aga ctg aag gac aag ctt gca gta att acc ggc ggt gcc 48
Met Thr Gln Arg Leu Lys Asp Lys Leu Ala Val Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

aac ggc atc ggg cgg gca att gcg gag cga ttt gcg gtc gaa ggt gcc 96
Asn Gly Ile Gly Arg Ala Ile Ala Glu Arg Phe Ala Val Glu Gly Ala
20 25 30

gac atc gca atc gcg gat ctg gtg ccg gcc ccg gaa gcc gag gca gca 144
Asp Ile Ala Ile Ala Asp Leu Val Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ala Ala
35 40 45

atc agg aac ctc ggt cgg cgc gtt ctg acc gtg aag tgc gat gtc tcg 192
Ile Arg Asn Leu Gly Arg Arg Val Leu Thr Val Lys Cys Asp Val Ser
50 55 60

caa cct ggc gac gta gaa gca ttc gga aag cag gtc atc tcc acg ttt 240
Gln Pro Gly Asp Val Glu Ala Phe Gly Lys Gln Val Ile Ser Thr Phe
65 70 75 80

ggt cgc tgc gac atc ctc gtc aac aac gcg gga att tac ccg ctg att 288
Gly Arg Cys Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Tyr Pro Leu Ile
85 90 95

cct ttt gac gag ctg acc ttt gaa cag tgg aag aaa aca ttc gag atc 336
Pro Phe Asp Glu Leu Thr Phe Glu Gln Trp Lys Lys Thr Phe Glu Ile
100 105 110

aac gtc gat tca ggt ttt ctt atg gcg aag gct ttt gtc ccc ggg atg 384
Asn Val Asp Ser Gly Phe Leu Met Ala Lys Ala Phe Val Pro Gly Met
115 120 125

aag agg aac ggg tgg gga cgc atc atc aac ctg act tcg acg aca tat 432
Lys Arg Asn Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Leu Thr Ser Thr Thr Tyr
130 135 140

tgg cta aag atc gag gcg tat acc cat tac atc agc acg aaa gcg gca 480
Trp Leu Lys Ile Glu Ala Tyr Thr His Tyr Ile Ser Thr Lys Ala Ala
145 150 155 160

aac ata ggc ttt acc cgc gcc ctt gcc tcg gac ctg ggg aag gac gga 528
Asn Ile Gly Phe Thr Arg Ala Leu Ala Ser Asp Leu Gly Lys Asp Gly
165 170 175

atc act gtt aac gcc atc gcg ccg agc ctt gtc cgc acg gca aca acc 576
Ile Thr Val Asn Ala Ile Ala Pro Ser Leu Val Arg Thr Ala Thr Thr
180 185 190

gaa gct tct gca ttg tcc gcg atg ttc gac gtg ctg cca aac atg ctt 624
Glu Ala Ser Ala Leu Ser Ala Met Phe Asp Val Leu Pro Asn Met Leu
195 200 205

cag gcg att ccg cgt ctt cag gtg ccc ctg gat ctg acg ggc gca gct 672
Gln Ala Ile Pro Arg Leu Gln Val Pro Leu Asp Leu Thr Gly Ala Ala
210 215 220

gcg ttc ctg gct tcc gat gac gcc agt ttt att aca ggc cag acg ctc 720
Ala Phe Leu Ala Ser Asp Asp Ala Ser Phe Ile Thr Gly Gln Thr Leu
225 230 235 240

gcg gtt gat ggc ggt atg gtg aga cac tga 750
Ala Val Asp Gly Gly Met Val Arg His
245

- 5 <210> 2
- <211> 249
- <212> PRT
- <213> Aromatoleum aromaticum EbN1
- <400> 2

ES 2 663 272 T3

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

Asn Gly Ile Gly Arg Ala Ile Ala Glu Arg Phe Ala Val Glu Gly Ala
 20 25 30

Asp Ile Ala Ile Ala Asp Leu Val Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ala Ala
 35 40 45

Ile Arg Asn Leu Gly Arg Arg Val Leu Thr Val Lys Cys Asp Val Ser
 50 55 60

Gln Pro Gly Asp Val Glu Ala Phe Gly Lys Gln Val Ile Ser Thr Phe
 65 70 75 80

Gly Arg Cys Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Tyr Pro Leu Ile
 85 90 95

Pro Phe Asp Glu Leu Thr Phe Glu Gln Trp Lys Lys Thr Phe Glu Ile
 100 105 110

Asn Val Asp Ser Gly Phe Leu Met Ala Lys Ala Phe Val Pro Gly Met
 115 120 125

Lys Arg Asn Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Leu Thr Ser Thr Thr Tyr
 130 135 140

Trp Leu Lys Ile Glu Ala Tyr Thr His Tyr Ile Ser Thr Lys Ala Ala
 145 150 155 160

Asn Ile Gly Phe Thr Arg Ala Leu Ala Ser Asp Leu Gly Lys Asp Gly
 165 170 175

Ile Thr Val Asn Ala Ile Ala Pro Ser Leu Val Arg Thr Ala Thr Thr
 180 185 190

Glu Ala Ser Ala Leu Ser Ala Met Phe Asp Val Leu Pro Asn Met Leu
 195 200 205

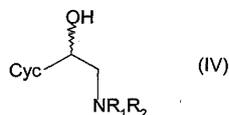
Gln Ala Ile Pro Arg Leu Gln Val Pro Leu Asp Leu Thr Gly Ala Ala
 210 215 220

Ala Phe Leu Ala Ser Asp Asp Ala Ser Phe Ile Thr Gly Gln Thr Leu
 225 230 235 240

Ala Val Asp Gly Gly Met Val Arg His
 245

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de alcoholes ópticamente activos sustituidos de la fórmula IV



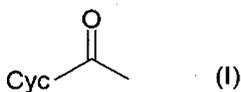
5 en la que

Cyc representa un anillo mono o polinuclear, saturado o insaturado, carbocíclico o heterocíclico, dado el caso sustituido una o varias veces, el cual porta al menos un grupo hidroxilo libre, y R_1 y R_2 independientemente uno de otro representan H o un radical alquilo dado el caso sustituido una o varias veces;

o de sales de este compuesto; en cada caso en forma de estereoisómero puro o como mezcla de estereoisómeros,

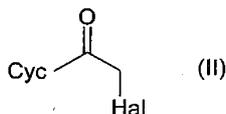
10 en el que

a) una cetona de la fórmula I



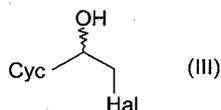
en la que Cyc posee los significados indicados anteriormente,

15 reacciona con un agente de halogenación en presencia de un alcohol alifático hasta dar un compuesto halogenado de la fórmula II



en la que Cyc tiene los significados indicados anteriormente y Hal representa un átomo de halógeno;

b) el compuesto de la fórmula II así obtenido es reducido por vía enzimática usando una enzima elegida de entre alcoholdehidrogenasas (ADH) (E.C. 1.1.1.1), hasta dar el alcohol de la fórmula III



20

en la que Cyc y Hal tienen los significados indicados anteriormente; y

c) el alcohol de la fórmula III así obtenido reacciona con una amina de la fórmula HNR_1R_2 , en la que R_1 y R_2 tienen los significados indicados anteriormente; hasta dar el compuesto de la fórmula IV.

25 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la reacción de la etapa a) ocurre en presencia de 1 a 10 equivalentes molares de alcohol por cada mol de alcano de la fórmula I.

3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la reacción química de la etapa c) ocurre en solución en un éter de cadena abierta o cíclico.

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la alcoholdehidrogenasa es elegida de entre enzimas de microorganismos del género *Aromatoleum*.

30 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la enzima para la etapa b) es elegida de entre enzimas que poseen una secuencia de polipéptidos, que es elegida de entre

(i) SEQ ID NO: 2 o

(ii) secuencias en las que hasta 25% de los radicales aminoácido están modificados respecto a SEQ ID NO: 2 mediante adición, eliminación, inserción, sustitución, inversión o una combinación de ellas, y / o que aún exhibe por lo menos 50% de la actividad enzimática de SEQ ID NO:2.

35

6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la reacción de la etapa b) es ejecutada mediante adición de equivalentes de reducción y dado el caso se regeneran los equivalentes de reducción consumidos en la reacción.
- 5 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que se ejecuta la regeneración por vía enzimática, electroquímica o electroenzimática.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la regeneración ocurre por vía enzimática y la enzima que regenera es elegida de entre ADH y deshidrogenasas diferentes de ADH.
- 10 9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la reacción de la etapa b) ocurre en presencia de un microorganismo el cual expresa de manera natural o recombinante la ADH, o en presencia de una fracción derivada de ella, que contiene la ADH, o en presencia de un extracto derivado de ella que contiene la ADH.
- 15 10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la reacción de la etapa b) ocurre en presencia de un microorganismo que produce ADH, el cual es elegido de entre bacterias de las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Lactobacillaceae, Streptomycetaceae, Rhodococcaceae, Rhodocyclaceae y Nocardiaceae, o en presencia de una fracción o un extracto derivado de ellos que tiene ADH.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el microorganismo es un microorganismo recombinante, que es transformado con un fragmento de ácido nucleico, el cual codifica para una alcoholdehidrogenasa de acuerdo con la definición de una de las reivindicaciones 4 a 6.
- 20 12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que se ejecuta la etapa b) en un medio de reacción líquido bifásico.
13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que se usa un medio de reacción acuoso-orgánico, en el que tanto el reactivo de la fórmula II como también el producto de la fórmula III se disuelven mejor en la fase orgánica que en la fase acuosa.
- 25 14. uso de una alcoholdehidrogenasa de acuerdo con la definición de una de las reivindicaciones 1 a 6 o un microorganismo que produce esta enzima, para la preparación de un compuesto de la fórmula IV.

SEQ ID NO:1 Secuencia de ácidos nucleicos de la feniletanol deshidrogenasa de *Azoarcus* sp EbN1 (banco de gen ID 25956124, región: 25073 a 25822)

```

1 atgacgcaaa gactgaagga caagcttgca gtaattaccg gcggtgccaa cggcatcggg
61 cgggcaattg cggagcgatt tgcggtcgaa ggtgccgaca tcgcaatcgc ggatctggtg
121 cgggccccgg aagccgaggc agcaatcagg aacctcggtc ggcgcgttct gaccgtgaag
181 tgcgatgtct cgcaacctgg cgacgtagaa gcattcggaa agcaggatcat ctccacgttt
241 ggtcgctgcg acatcctcgt caacaacgcg ggaatttacc cgctgattcc ttttgacgag
301 ctgacctttg aacagtggaa gaaaacattc gagatcaacg tcgattcagg ttttcttatg
361 gcgaaggctt ttgtccccgg gatgaagagg aacgggtggg gacgcatcat caacctgact
421 tcgacgacat attggctaaa gatcgaggcg tataccatt acatcagcac gaaagcggca
481 aacataggct ttaccgcgpc cttgcctcgc gacctgggga aggacggaat cactgttaac
541 gccatcgcgc cgagccttgt cgcacggca acaaccgaag cttctgcatt gtccgcgatg
601 ttcgacgtgc tgccaaacat gcttcaggcg attccgcgtc ttcaggatgcc cctggatctg
661 acggggcgag ctgcgttctt ggcttcgat gacgccagtt ttattacagg ccagacgctc
721 gcggttgatg gcggtatggt gagacactga

```

SEQ ID NO:2 Secuencia de aminoácidos de la feniletanol deshidrogenasa de *Azoarcus* sp EbN1 (banco de gen ID CAD58337)

```

1 MTQRLKDKLA VITGGANGIG RAIARFAVE GADIAIADLV PAPEAEAAIR
51 NLGRRVLTVK CDVSQPGDVE AFGKQVISTF GRCDILVNNA GIYPLIPFDE
101 LTFEQWKKTF EINVDSGFLM AKAFVPGMKR NGWGRIINLT STTYWLKIEA
151 YTHYISTKAA NIGFTRALAS DLGKDGITVN AIAPSLVRTA TTEASALSAM
201 FDVLPNMLQA IPRLQVPLDL TGAAAFSLASD DASFITGQTL AVDGGMVRH

```

Fig. 1