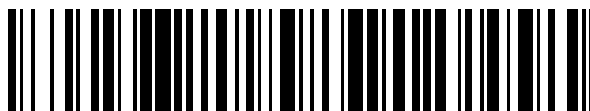


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 031**

51 Int. Cl.:

C12P 17/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2014 PCT/EP2014/058547**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177492**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2014 E 14722148 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2992106**

54 Título: **Procedimiento enzimático de producción de (R)-3-quinuclidinol**

30 Prioridad:

30.04.2013 DE 102013104418

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

18.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 682 031 T3

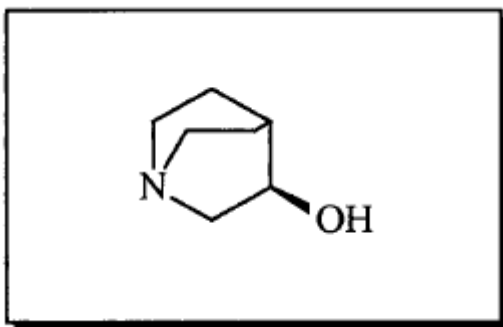
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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 enzimático de producción de (R)-3-quinuclidinol

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de (R)-3-quinuclidinol ((3R)-1-azabicyclo [2.2.2] octan-3-ol, CAS #: 25333-42-0) o una sal del mismo (CAS #: 42437-96-7) de alta pureza óptica, \



(R)-3-quinuclidinol [(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ol]

que comprende hacer reaccionar quinuclidin-3-ona con nuevas oxidoreductasas usando preferiblemente NADH como cofactor.

10 Antecedentes de la técnica

El (R)-3-quinuclidinol es un intermedio valioso para la síntesis de una amplia gama de productos farmacéuticos. En la industria farmacéutica se usa, por ejemplo, como sintón quiral para el potenciador de la cognición *Talsaclidine*, el agente para la incontinencia urinaria *Solifenacin* o el antagonista M_3 *Revatropate* para el tratamiento del asma. Existen diferentes procedimientos conocidos para obtener quinuclidinol ópticamente activo tal como una reacción de reducción química usando un catalizador metálico (véase JPH9-194480A), resolución de mezclas racémicas de ésteres de (\pm)-3-quinuclidinol por reacción de hidrólisis enzimática (véase US5215918B, JPH10-136995A, JPH10-210997A, JPH9-194480A), y la reducción enzimática de quinuclidin-3-ona usando biocatalizadores de células enteras o enzimas aisladas (véanse JP10243795, JP11196890, JP2002153293, JP2000245495).

20 Se informa que la preparación de (R)-3-quinuclidinol ópticamente puro a través de la reducción con catalizadores metálicos proporciona una eficacia inadecuada para la aplicación industrial, dado que la pureza óptica del producto de reducción es baja y se requieren etapas de purificación adicionales para obtener enantiómeros puros.

La preparación de (R)-3-quinuclidinol ópticamente puro a través de la resolución de mezclas racémicas de ésteres de (\pm)-3-quinuclidinol con proteasa tampoco es apropiada para la aplicación industrial, debido a la necesidad de eliminar los ésteres restantes de la mezcla de reacción y el consiguiente alto coste asociado.

25 Se ha informado la preparación de (R)-3-quinuclidinol ópticamente puro a través de la reducción enzimática de quinuclidin-3-ona a través de la biotransformación completa para células de los géneros *Nakazaewaea*, *Candida*, *Proteus*, *Rhodotorula*, *Sporidiolobus*, *Rhodospodium*, *Schizosaccharomyces*, *Cryptococcus*, *Trichisporon*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Filobasidium*, *Aureobasidium*, *Yarrowia*, *Geotrichum*, *Tsukamurella*, *Kurthia*, *Microbacterium*, *Kluyveromyces*, *Acremonium* y *Mucor* (véanse, JP10243795, JP11196890, JP2002153293, JP2000245495). Las impurezas producidas por las células microbianas y/o reacciones secundarias causadas por otras enzimas contenidas en los microorganismos reducen la pureza óptica y el rendimiento del producto.

35 La preparación de (R)-3-quinuclidinol a través de procesos de oxidorreducción usando enzimas aisladas también se conoce en la técnica y se ha informado de enzimas de plantas de los géneros *Datura* y *Hyoscyamus* (Patente JP2003230398), así como enzimas de *Rhodotorula* (JP2007124922), *Burkholderia* (WO2010123062) y *Microbacterium luteolum* (Int J Mol Sci. 2012 Oct 19;13(10):13542-53). Recientemente, se ha cristalizado un alcohol deshidrogenasa, que reduce la quinuclidin-3-ona a partir de *Agrobacterium tumerfacience* (Acta crystallografica 10(2012) 68 (Pt 10): 1237-1239).

40 Debido al origen vegetal, las enzimas derivadas de *Datura* e *Hyoscyamus* son difíciles de fabricar industrialmente. Las enzimas que se originan en *Rhodotorula* y *Burkholderia* requieren NADPH caro como cofactor y glucosa deshidrogenasa para la regeneración de NADPH, lo que hace que el procedimiento de fabricación sea muy costoso.

Hasta la fecha, el procedimiento más eficiente para la producción de (R)-3-quinuclidinol es informado por Isotani et al. (Int J Mol Sci. 2012 Oct 19;13(10):13542-53) para el procedimiento de reducción usando enzimas de *Microbacterium luteolum*. Las enzimas derivadas de *Microbacterium luteolum* requieren NADH como cofactor y una alcohol deshidrogenasa secundaria para la regeneración del cofactor junto con 2-propanol como cosustrato. Sin embargo, en este procedimiento de reducción enzimática, la carga del sustrato es limitada, supuestamente debido al efecto inhibitorio de la quinuclidin-3-ona sobre la actividad enzimática. Se podría lograr una carga máxima de sustrato del 10 % (p/v) añadiendo continuamente sustrato al lote de reacción, manteniendo así la concentración de quinuclidin-3-ona en el recipiente de reacción y la inhibición concomitante de las enzimas a un nivel apropiado. Se logró un rendimiento de conversión del 100 % a una carga de sustrato del 15 % (p/v) usando enzimas inmovilizadas. Sin embargo, la inmovilización de enzimas es elaborada y costosa e impone limitaciones en el volumen de reacción, que no son acordes con los requisitos de un procedimiento de fabricación industrial.

El artículo "Expression, purification, crystallization and X-ray analysis of 3-quinuclidinone reductase from *Agrobacterium tumefaciens*"; F. Hou, T. Miyakawa, D. Takeshita, M. Kataoka, A. Uzura, K. Nagata, S. Shimizu, M. Tanokura; Acta Crystallographica Section F; 2012; pp. 1237-1239 describe la sobreexpresión, purificación, cristalización y análisis estructural de la reductasa AtQR de *Agrobacterium tumefaciens*, que cataliza la reducción de 3-quinuclidinona a (R)-3-quinuclidinol con NADH como cofactor. El AtQR recombinante se obtuvo por sobreexpresión en *Escherichia coli*, se purificó, se cristalizó con NADH por difusión de vapor gota a gota y posteriormente se analizó por difracción de rayos X usando radiación de sincrotrón en Photon Factory, Tsukuba.

El documento científico "Structural basis for high substrate-binding affinity and enantioselectivity of 3-quinuclidinone reductase AtQR"; F. Hou, T. Miyakawa, M. Kataoka, D. Takeshita, S. Kumashiro, A. Uzura, N. Urano, K. Nagata, S. Shimizu, M. Tanokura; Biochem Biophys Res Comm; 2014; pp. 911-913 describen la estructura de AtQR de *Agrobacterium tumefaciens*, que cataliza la reducción de 3-quinuclidinona a (R)-3-quinuclidinol con NADH como cofactor. Con base en la estructura de AtQR, los autores calculan la afinidad de unión del sustrato y explican el mecanismo catalítico.

El documento JP 2008-212144 se refiere a una alcohol deshidrogenasa que es capaz de reducir asimétricamente 3-quinuclidinona o una de sus sales a (R)-3-quinuclidinol usando NADH como coenzima a alta pureza óptica y rendimiento.

El documento CN 103555608 A describe una quinonona reductasa y su aplicación para la síntesis asimétrica de (R)-3-quinuclidinol.

El artículo "Highly Efficient Synthesis of (R)-3-Quinuclidinol in a Space-Time Yield of 916 g L⁻¹ d⁻¹ Using a New Bacterial Reductase ArQ "; W.-X. Zhang, G.-C Xu, L. Huang, J. Pan, H.-L. Yu, J.-H. Xu; Organic Letters; 2013 Vol. 15, 19; pp. 4917-4919 describe una ceto reductasa derivada de *Agrobacterium radiobacter ECU 2556* para la reducción enantioselectiva de 3-quinuclidinona a (R)-3-quinuclidinol usando NADH como coenzima.

El documento científico "Structural basis of stereospecific reduction by quinuclidinone reductase"; D. Takeshita, M. Kataoka, T. Miyakawa, K.-I. Miyazono, S. Kumashiro, T. Nagai, N. Urano, A. Uzura, K. Nagata, S. Shimizu, M. Tanokura; AMB Express; 2014 Vol. 4, 6; pp. 1-10 se refiere a la estructura y el sitio de unión de una 3-quinuclidinona reductasa dependiente de NADPH (RrQR) de *Rhodotorula rubra*.

El número de enzimas conocidas para la reducción de quinuclidin-3-ona es limitado. Además, estas enzimas no están disponibles comercialmente y los procesos de reducción correspondientes tienen inconvenientes importantes. De este modo, existe la necesidad de un procedimiento eficiente e industrialmente aplicable de producción de (R)-3-quinuclidinol con nuevas oxidorreductasas recombinantes usadas como biocatalizador en la reacción de reducción.

Una oxidorreductasa apropiada para un procedimiento de reducción industrial de 3-quinuclidinona debe cumplir los siguientes requisitos:

- 1) expresión conmensurada en cepa recombinante (por ejemplo, en *Escherichia coli*);
- 2) alta estabilidad en solventes orgánicos, en particular en solventes orgánicos miscibles en agua tales como 2-propanol y 2-butanol;
- 3) actividad enzimática a alta concentración del sustrato 3-quinuclidinona sin verse adversamente afectada por la inhibición del sustrato o del producto;
- 4) el cumplimiento de la regeneración del cofactor acoplado a la enzima, en particular la regeneración del cofactor a través de la alcohol deshidrogenasa usando alcoholes secundarios como cosustratos.

La presente invención tiene el objetivo de proporcionar un procedimiento de preparación de (R)-3-quinuclidinol reduciendo quinuclidin-3-ona o una sal del mismo usando un cofactor y una oxidorreductasa aislada, un organismo recombinante que expresa dicha oxidorreductasa, o una preparación de un organismo que expresa dicha oxidorreductasa, tal como sus células permeabilizadas, lisadas o liofilizadas. La oxidorreductasa se selecciona de

- a) polipéptidos con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 de la lista de secuencias; o
- b) polipéptidos con una secuencia de aminoácidos derivada de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 por sustitución, eliminación o adición de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, veintiséis, veintisiete, veintiocho, veintinueve, treinta, treinta y uno, treinta y dos, treinta y tres, treinta y cuatro, treinta y cinco, treinta y seis, treinta y siete, treinta y ocho, treinta y nueve, o cuarenta residuos de aminoácidos y que son capaces de reducir la quinuclidin-3-ona junto con un cofactor; o
- 10 c) polipéptidos con una secuencia de aminoácidos, en la que al menos el 65 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3, o en los que al menos el 70 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3, o en los que al menos 75 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:9, o en los que al menos 85 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:9, más preferiblemente en los que al menos 90 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:9, y que son capaces de reducir la quinuclidin-3-ona junto con un cofactor; o
- 15 d) polipéptidos con una secuencia de aminoácidos, en la que al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de la SEQ ID NO:7, y que son capaces de reducir la quinuclidin-3-ona junto con un cofactor; o
- 20 e) polipéptidos que están codificados por un polinucleótido con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10 de la lista de secuencias; o
- f) polipéptidos que están codificados por un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que hibrida con el complemento de longitud completa de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10 bajo condiciones rigurosas, y que son capaces de reducir la quinuclidin-3-ona junto con un cofactor; en la que los polipéptidos comprenden un motivo de secuencia de aminoácidos MQX₁REX₂X₃WEA, en el que cada uno de X₁, X₂, X₃ es cualquiera de los residuos de aminoácidos A (Ala), R (Arg), N (Asn), D (Asp), C (Cys), Q (Gln), E (Glu), G (Gly), H (His), I (Ile), L (Leu), K (Lys), M (Met), F (Phe), P (Pro), S (Ser), T (Thr), W (Trp), Y (Tyr) o V (Val).
- 25 Preferiblemente, la oxidorreductasa se usa junto con el cofactor NADH o NADPH.

Se ha descubierto que los polipéptidos según a) o b) o c) o d) o f) son capaces de reducir eficientemente la quinuclidin-3-ona a su correspondiente (R)-alcohol. Sorprendentemente, la homología de secuencia (identidad) entre los polipéptidos para uso en la presente invención (véase la tabla 1) varía de 48 % a 72 %. Sin embargo, los polipéptidos tienen un motivo de secuencia de aminoácidos específico MQX₁REX₂X₃WEA en común, que es característico de la actividad enzimática de estas proteínas en la reducción de quinuclidin-3-ona.

35

	SEQ ID NO: 1 Mycobacterium Vanbaalenii	SEQ ID NO:3 Mycobacterium smegmatis	SEQ ID NO:5 Caldilinea aerophila	SEQ ID NO:7 Starkeya novella	SEQ ID NO:9 Oceanithermus profundus
SEQ ID NO: 1 Mycobacterium Vanbaalenii	100	72 %	53 %	50 %	47 %
SEQ ID NO:3 Mycobacterium smegmatis	72 %	100	53 %	48 %	45 %
SEQ ID NO:5 Caldilinea aerophila	53 %	53 %	100	50 %	57 %
SEQ ID NO:7 Starkeya novella	50 %	48 %	50 %	100	52 %
SEQ ID NO:9 Oceanithermus profundus	47 %	45 %	57 %	52 %	100

El motivo de secuencia MQX₁ReX₂X₃WEA está situado proximal al extremo C de las proteínas. Este hallazgo es proporcional a la estructura cristalina y por consiguiente en base al modelo de homología de la alcohol deshidrogenasa de cadena corta conocida, que revela que este motivo forma una cola de un bolsillo de unión de sustrato de la deshidrogenasa, en la que los residuos amino M, Q, R, E, W, E y A interactúan con el sustrato. De este modo, se postula que las alcohol deshidrogenasas de cadena corta que comprenden dicho motivo MQX₁REX₂X₃WEA son apropiadas para la reducción de quinuclidin-3-ona.

Una oxidoreductasa apropiada para la reducción de quinuclidin-3-ona, preferiblemente al correspondiente R-alcohol, se entiende que es un polipéptido que en condiciones de reacción optimizadas produce un exceso enantiomérico del R-alcohol de al menos 50 %. En este documento, se entiende que las condiciones de reacción optimizadas son las condiciones de reacción en las que un polipéptido produce un exceso enantiomérico máximo del alcohol-R.

Se ha encontrado que los polipéptidos para usar en la presente invención proporcionan actividades apropiadas de oxidorreductasa y se pueden usar para reducir la quinuclidin-3-ona preferiblemente a (R)-3-quinuclidinol. El exceso enantiomérico alcanzable del alcohol R asciende a más de o igual a 50 %, preferiblemente mayor que o igual a 80 % y en particular preferiblemente mayor que o igual a 95 %. Cuando se usa la SEQ ID NO: 1, se puede lograr un exceso enantiomérico superior o igual al 99 %.

Las oxidorreductasas capaces de reducir la quinuclidin-3-ona al correspondiente (R)-3-quinuclidinol se pueden aislar a partir de bacterias del género *Mycobacterium*, en particular desde *Mycobacterium vanbaalenii* o desde *Mycobacterium smegmatis*, desde bacterias del género *Caldilinea*, en particular desde *Caldilinea aerophila*, desde bacterias del género *Starkeya*, en particular desde *Starkeya novella*, desde bacterias del género *Oceanithermus*, en particular desde *Oceanithermus profundum*.

Los polinucleótidos que codifican la oxidorreductasa para su uso en la presente invención se pueden obtener, por ejemplo, a partir del ADN genómico de la cepa PYR-1 de *Bacterium Mycobacterium vanbaalenii* o de la cepa ATCC 700084 de *Mycobacterium smegmatis*, de las bacterias del género *Caldilinea*, en particular de la cepa DSM 14535 de *Caldilinea aerophila*, de bacterias del género *Starkeya*, en particular de la cepa de DSM 506 de *Starkeya novella*, de bacterias del género *Oceanithermus*, en particular de *Oceanithermus profundum* usando técnicas de biología molecular conocidas.

El organismo que produce la oxidorreductasa es preferiblemente un organismo recombinante que sobreexpresa la oxidorreductasa. Preferiblemente, pero no se limita a, tal organismo recombinante es *Escherichia coli*. La oxidorreductasa expresada por un organismo recombinante puede usarse cualquiera en un estado completamente purificado, en un estado parcialmente purificado o como células que contienen el polipéptido. Las células que expresan el polipéptido se pueden usar en un estado nativo, permeabilizado, lisado o liofilizado.

Se describe adicionalmente el organismo que produce esta oxidorreductasa o una preparación de un organismo que expresa dicha oxidorreductasa, tales como sus células permeabilizadas, lisadas o liofilizadas, capaces de reducir enantioselectivamente la quinuclidin-3-ona a su correspondiente alcohol usando un cofactor.

Preferiblemente, la oxidorreductasa se usa junto con el cofactor NADH o NADPH.

En la presente divulgación, el término "secuencia de aminoácidos (A), en el que el (P) % porcentaje de aminoácidos es idéntico a los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: (N)" se refiere a la secuencia de aminoácidos (A) y SEQ ID NO: (N) estando alineados en toda su longitud y en la que cualquiera de las secuencias de aminoácidos alineadas (A) y SEQ ID NO: (N) alineadas pueden comprender inserciones de brechas en relación con sus respectivas secuencias no alineadas. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones en las que se producen residuos de aminoácidos idénticos tanto en la secuencia de aminoácidos alineada (A) como en la SEQ ID NO: (N) alineada, y dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de residuos en la secuencia de referencia. El resultado, multiplicado por 100, produce el porcentaje de identidad. La alineación de las secuencias se puede llevar a cabo usando los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., 1977, *Nucleic Acids Res.* 3389-3402 y Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

El término "aminoácido suprimido" o "delección" se refiere a la modificación de un polipéptido mediante la eliminación de uno o más aminoácidos, en una parte interna y/o terminal de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 mientras se retiene la actividad enzimática.

El término "inserción" se refiere a la modificación de un polipéptido mediante la adición de uno o más aminoácidos al polipéptido en diversas posiciones en una parte interna y/o terminal de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9.

La sustitución se refiere a la sustitución de uno o más aminoácidos en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 y puede ser conservadora y/o no conservadora. La sustitución de aminoácidos conservadora se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene cadenas laterales similares o que pertenece a la misma clase de aminoácidos, por ejemplo, desde hidrófilo a

ES 2 682 031 T3

hidrófilo, desde hidrófobo a hidrófobo, desde no polar a no polar, polar a polar, ácido a ácido, básico a básico, aromático a aromático. Ejemplos de sustituciones conservadoras se enumeran en la siguiente tabla:

Residuo	Sustituciones conservadoras
Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Gly	Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Gly
Asp, Glu	Asp, Glu
Gly, Met	Ala, Gly, Met
Lys, Arg	Lys, Arg
Asn, Gln, His	Asn, Gln, His
Trp, Phe, Tyr	Trp, Phe, Tyr

5 La sustitución no conservadora se refiere al reemplazo de un aminoácido en el polipéptido con un aminoácido con propiedades de cadena lateral y/o fisicoquímicas significativamente diferentes. La sustitución de aminoácidos no conservadora puede afectar la estructura del polipéptido, su hidrofobicidad y/o su carga neta.

De acuerdo con lo anterior, la divulgación también se refiere a polipéptidos con la secuencia de aminoácidos enumerada a continuación, que comprende en cada una de las posiciones 1-282 un aminoácido seleccionado del grupo de selección correspondiente encerrado entre paréntesis cuadrados [...], en el que "-" designa un espacio:

Posición Aminoácido

1	[-M]
2	[-FKLMRST]
3	[-L]
4	[-FM]
5	[-IPY]
6	[-AEP]
7	[-ADGQV]
8	[-DGQST]
9	[-ALMTV]
10	[-AGPQT]
11	[-AEHPST]
12	[-KNPQ]
13	[-IKQRSV]
14	[-FGHLTY]
15	[-APT]
16	[-DEGN]
17	[-LST]
18	[-AEKPRS]
19	[-DEGKST]
20	[-L]
21	[-KLPQR]

ES 2 682 031 T3

(Continuación)

Posición	Aminoácido
22	[-IKLNRSTV]
23	[-AIV]
24	[AFGILMV]
25	[ILV]
26	[T]
27	[G]
28	[AG]
29	[AG]
30	[AGRST]
31	[G]
32	[I]
33	[G]
34	[AKLRW]
35	[AG]
36	[ACIMV]
37	[AC]
38	[ADEHKLNQRST]
39	[ARST]
40	[LMY]
41	[AHSTV]
42	[AEGHKLQR]
43	[DEHQR]
44	[ADEGN]
45	[AFIRVW]
46	[AGKQRTW]
47	[ILV]
48	[AITWW]
49	[AIV]
50	[ACGIT]
51	[-D]
52	[-FILRV]
53	[-DN]
54	[-AEFGIKLPV]

ES 2 682 031 T3

(continuación)

Posición	Aminoácido
55	[ADEGKRT]
56	[AFGLSW]
57	[AK]
58	[ADEKNQRS]
59	[ADEKNQRST]
60	[ATVW]
61	[ASV]
62	[ADEGHQS]
63	[ADEGS]
64	[ILV]
65	[-EGPRS]
66	[-ADEGKNQS]
67	[-A]
68	[-AEPQST]
69	[-DGLPST]
70	[-AEGRST]
71	[DEGHIMQR]
72	[-AHPST]
73	[-AEHILRTV]
74	[AGHLPS]
75	[-AHILRVW]
76	[AEGKPQRT]
77	[AILMV]
78	[D]
79	[V]
80	[RT]
81	[DEKNRS]
82	[APQR]
83	[ADENST]
84	[ADEGNQS]
85	[AILV]
86	[AEKQS]
87	[AKQRST]

ES 2 682 031 T3

(continuación)

Posición	Aminoácido
88	[ALTV]
89	[ACFILRT]
90	[ADEQRS]
91	[ADEQRSTV]
92	[AILV]
93	[AILSTY]
94	[ADEG]
95	[AEIKLR]
96	[DFILMRY]
97	[GP]
98	[-GR]
99	[CILVY]
100	[DEGH]
101	[AILV]
102	[CLMVW]
103	[CHIV]
104	[ANS]
105	[N]
106	[A]
107	[G]
108	[IV]
109	[S]
110	[AFST]
111	[M]
112	[AEHNQR]
113	[AHKPR]
114	[AF]
115	[ILV]
116	[DE]
117	[AILV]
118	[PST]
119	[ADEIPV]
120	[DEGKQR]
121	[DEQR]

ES 2 682 031 T3

(continuación)

Posición	Aminoácido
122	[FLWY]
123	[ADENQ]
124	[FQRY]
125	[NST]
126	[FLMV]
127	[ADNQS]
128	[IV]
129	[N]
130	[ALT]
131	[KR]
132	[AG]
133	[ITV]
134	[F]
135	[FILVY]
136	[ACSTV]
137	[GLNS]
138	[Q]
139	[AEIQTV]
140	[AFV]
141	[AGLT]
142	[R]
143	[AEHQR]
144	[FM]
145	[IKLSTV]
146	[ADEKNRS]
147	[AEQST]
148	[AEGNPQ]
149	[-IKPQRTV]
150	[-ADGKMPQRV]
151	[-P]
152	[-GNS]
153	[-ERS]
154	[-GS]
155	[-LV]

(continuación)

Posición	Aminoácido
156	[-GR]
157	[-G]
158	[CKMSTV]
159	[IL]
160	[IV]
161	[AN]
162	[ITV]
163	[A]
164	[S]
165	[LM]
166	[A]
167	[AG]
168	[KR]
169	[IQRV]
170	[AG]
171	[-NR]
172	[AV]
173	[P]
174	[FLW]
175	[L]
176	[AST]
177	[DH]
178	[Y]
179	[SV]
180	[A]
181	[S]
182	[K]
183	[F]
184	[AG]
185	[V]
186	[ILV]
187	[G]
188	[LW]

ES 2 682 031 T3

(continuación)

Posición	Aminoácido
189	[TV]
190	[Q]
191	[AG]
192	[AFLM]
193	[A]
194	[CFGKRY]
195	[E]
196	[FL]
197	[AG]
198	[ADEPSV]
199	[DFHKQRSY]
200	[GHKQRS]
201	[I]
202	[LRT]
203	[V]
204	[N]
205	[ACS]
206	[IV]
207	[CN]
208	[P]
209	[G]
210	[FY]
211	[V]
212	[AEKR]
213	[T]
214	[GPS]
215	[M]
216	[Q]
217	[EST]
218	[R]
219	[E]
220	[AILV]
221	[ADEGQSV]

ES 2 682 031 T3

(continuación)

Posición	Aminoácido
222	[W]
223	[E]
224	[A]
225	[AEHKMQRST]
226	[L]
227	[RST]
228	[GNQS]
229	[ILMSTV]
230	[ST]
231	[EPST]
232	[ADEQ]
233	[AEGQRV]
234	[V]
235	[FIKLQRV]
236	[ADENQ]
237	[ADELMS]
238	[MWY]
239	[ILV]
240	[ADGKQRS]
241	[ADQ]
242	[T]
243	[P]
244	[L]
245	[AGR]
246	[R]
247	[IL]
248	[EQ]
249	[AELQRT]
250	[AP]
251	[DE]
252	[D]
253	[IV]
254	[A]

Posición	Aminoácido
255	[DGKNRT]
256	[ALSV]
257	[AIV]
258	[AFISV]
259	[F]
260	[L]
261	[ACLV]
262	[GS]
263	[DEGNPS]
264	[ADLQS]
265	[AS]
266	[DGNR]
267	[F]
268	[IM]
269	[T]
270	[G]
271	[EQ]
272	[AG]
273	[ILV]
274	[AENS]
275	[V]
276	[NT]
277	[G]
278	[G]
279	[AV]
280	[FWY]
281	[IMT]
282	[DFT]

5 El número de modificaciones de aminoácidos en la secuencia polipeptídica se define en las reivindicaciones y puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 3, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 aminoácidos, mientras que retiene o mejora la actividad catalítica del polipéptido.

10 Los polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con el complemento de longitud completa de, por ejemplo, polinucleótidos con secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 comprenden polinucleótidos que son detectables mediante diversas técnicas de hibridación, tales como hibridación de colonias, hibridación de placas, hibridación Southern usando el complemento ADN de longitud completa de la SEQ ID NO: 2 como sonda de hibridación. Un procedimiento de hibridación apropiado se describe en Molecular Cloning, A laboratory manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Para la hibridación, el polinucleótido bajo investigación se inmoviliza en un filtro y se hibrida con el complemento polinucleotídico de, por ejemplo SEQ ID No: 2 en una solución de NaCl 0,7-1 M a 60°C. Posteriormente, el filtro se lava con una solución de SSC de 0,1 a 2 veces a 65°C, en la que se entiende que una solución de SSC de 1 vez es una mezcla que consiste en NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM.

- 5 Un polinucleótido que hibrida, por ejemplo, con el complemento de la SEQ ID No: 2 en condiciones rigurosas tiene una secuencia de nucleótidos, en la que al menos el 65 %, preferiblemente al menos el 70 % de nucleótidos son idénticos a los nucleótidos de la SEQ ID NO:2.

Una realización preferida de la invención se caracteriza porque el cofactor usado en el procedimiento se regenera continuamente por la acción de una oxidorreductasa en presencia de alcohol secundario. Preferiblemente, se usa NADH como el cofactor, reduciéndose el NAD formado en la reducción nuevamente a NADH.

10 La preferencia de cofactor de una oxidorreductasa por NADH se podría cambiar por la preferencia por NADPH y revertirse usando técnicas de mutagénesis mutando el sitio de unión del cofactor.

En los procedimientos según la invención, el cofactor oxidado NAD o NADP formado por la oxidorreductasa/deshidrogenasa se regenera preferiblemente de forma continua.

- 15 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el cofactor oxidado NAD o NADP se regenera por oxidación de un alcohol.

Preferiblemente, se usa un alcohol secundario de fórmula general R_xR_yCHOH para la regeneración de cofactores, en la que R_x y R_y se seleccionan independientemente de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_8 ramificado o no ramificado, en el que el número total de átomos de carbono es $C_{total} \geq 3$.

- 20 Los alcoholes secundarios tales como 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-heptanol, 2-octanol o ciclohexanol se usan preferiblemente como cosustratos. De acuerdo con una realización particularmente preferida, se usa 2-propanol o 4-metil-2-pentanol para la regeneración de coenzima. La cantidad de cosustrato para la regeneración puede variar en el caso de alcoholes secundarios miscibles con agua de 5 a 70 % en volumen, preferiblemente de 5 a 50 %, más preferiblemente de 5 a 40 %, más preferiblemente de 5 a 20 %, mientras que en el
25 en el caso de alcoholes secundarios inmiscibles en agua tales como metil-2-pentanol, la concentración preferida varía desde 5 a 80 %, más preferiblemente desde 20 a 80 %, más preferido desde 40 a 80 % en base al volumen total de los lotes de reacción.

De acuerdo con una realización preferida adicional de los procedimientos según la invención, se añade una oxidorreductasa/deshidrogenasa adicional para la regeneración del cofactor.

- 30 En una realización preferida adicional, adicionalmente se puede añadir una alcohol deshidrogenasa adicional para la regeneración del cofactor. Las alcohol deshidrogenasas dependientes de NADH apropiadas se pueden obtener, por ejemplo, de levadura de panadería, de *Candida parapsilosis* (CPCR) (la Patente de los Estados Unidos No. 5,523,223 y la Patente de los Estados Unidos No. 5,763,236, *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, 15(11):950-8), *Pichia capsulata* (EP1633779B1), a partir de *Rhodococcus erythropolis* (RECR) (la Patente de los Estados Unidos No. 5,523,223), *Norcardia fusca* (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(10), 1999, p. 1721-1729; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 62(4):380-6; Epub 2003, Apr. 26) o a partir de *Rhodococcus ruber* (*J. Org. Chem.*, 2003, 68(2):402-6). Los cosustratos apropiados para esas alcohol deshidrogenasas son, por ejemplo, los alcoholes secundarios ya mencionados tales como 2-propanol (isopropanol), 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-octanol o ciclohexanol.

- 40 Las alcohol deshidrogenasas secundarias apropiadas para la regeneración de NADPH son, por ejemplo, aquellas descritas anteriormente y aisladas de organismos del orden de Lactobacillales, por ejemplo, Lactobacillales, por ejemplo, *Lactobacillus kefir* (la Patente de los Estados Unidos No. 5,200,335), *Lactobacillus brevis* (DE 19610984 A1; *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2000 December; 56 Pt 12:1696-8), *Lactobacillus minor* (DE 10119274), *Leuconostoc carnosum* (A 1261/2005, Kl. C12N) o, como se describe, las de *Thermoanaerobium brockii*,
45 *Thermoanaerobium ethanolicum* o *Clostridium beijerinckii*.

Sin embargo, otros sistemas enzimáticos pueden, en principio, usarse también para la regeneración de cofactores. Por ejemplo, la regeneración del cofactor se puede efectuar usando formiato deshidrogenasa dependiente de NAD o NADP (Tishkov et al., *J. Biotechnol. Bioeng.* [1999] 64, 187-193, Pilot-scale production and isolation of recombinant NAD and NADP specific formate dehydrogenase). Los cosustratos apropiados de la formiato deshidrogenasa son,
50 por ejemplo, sales de ácido fórmico tales como formiato de amonio, formiato de sodio o formiato de calcio.

Para la conversión de 1 kg del sustrato quinuclidin-3-ona se debe aplicar 5000 a 10 Mio.Unidades de oxidorreductasa. La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima requerida para la conversión de 1 mmol de quinuclidin-3-ona en el alcohol correspondiente por minuto.

En los procedimientos según la invención, el sustrato quinuclidin-3-ona se usa en el lote de reacción preferiblemente en una cantidad desde 10 g/l a 500 g/l, preferiblemente de 25 g/l a 300 g/l, de forma particular preferida desde 50 g/l a 200 g/l, en base al volumen total.

5 La porción acuosa de la mezcla de reacción en la que procede la reducción enzimática contiene preferiblemente una solución reguladora, por ejemplo, una solución reguladora de fosfato de potasio, tris/HCl o trietanolamina, que tiene un valor de pH de 5 a 10, preferiblemente un pH desde 6 a 9. Además, la solución reguladora puede contener iones para estabilizar o activar las enzimas tales como, por ejemplo, iones de zinc o iones de magnesio.

Mientras se lleva a cabo el procedimiento según la invención, la temperatura varía adecuadamente de aproximadamente 10° C a 70° C, preferiblemente de 20° C a 45° C.

10 La concentración del cofactor, en particular de NADH o NADPH, respectivamente, en la fase acuosa generalmente varía desde 0,001 mM a 10 mM.

El TTN (número de renovación total = mol de compuesto reducido de fórmula I/mol de cofactor usado) conseguido en los procedimientos según la invención normalmente varía desde 10² a 10⁵, preferiblemente, sin embargo, es > = 103.

15 En el procedimiento según la invención, también se puede usar un estabilizador de oxidoreductasa/deshidrogenasa. Los estabilizantes apropiados son, por ejemplo, glicerol, sorbitol, 1,4-DL-ditiotreitol (DTT) o dimetilsulfóxido (DMSO).

De acuerdo con otra posible realización de la invención, el cosustrato oxidado (por ejemplo, acetona) puede eliminarse continuamente y/o puede añadirse nuevamente el cosustrato (por ejemplo, 2-propanol) de una manera continua con el fin de desplazar el equilibrio de la reacción hacia el producto de reacción.

20 Después de completar la reducción, la mezcla de reacción se procesa. Para este propósito, por ejemplo, la fase acuosa se separa opcionalmente de la fase orgánica y la fase orgánica que contiene el producto se filtra. Opcionalmente, la fase acuosa también se puede extraer y procesar adicionalmente como la fase orgánica. A continuación, el solvente se evapora de la fase orgánica y el producto de fórmula general II o III se obtiene como un producto en bruto. El producto en bruto se puede purificar posteriormente o usar directamente para la síntesis de un
25 producto resultante.

A continuación, la invención se ilustra adicionalmente a modo de ejemplos.

Ejemplo 1

Aislamiento de Oxidoreductasa a partir de *Mycobacterium vanbaalenii*

30 Para aislar la oxidoreductasa dependiente de NADH de *Mycobacterium vanbaalenii*, el microorganismo se cultivó en peptona 5,0 g, extracto de carne 3,0 g por litro de agua, pH 7,0.

Al alcanzar la fase estacionaria, las células se recogieron y se separaron del medio mediante centrifugación. Se suspendieron 5 g de células de *Mycobacterium vanbaalenii* con 20 ml de solución reguladora (trietanolamina 100 mM, MgCl₂ 1 mM, pH = 7,0) y se homogeneizaron. El extracto en bruto obtenido después de la centrifugación (7000 rpm) se purificó luego adicionalmente y se volvió a procesar a través de FPLC (cromatografía líquida de proteína
35 rápida). La oxidoreductasa se pudo purificar en cuatro etapas consecutivas mediante cromatografía de intercambio iónico en butil-sefarosa (Messrs. Pharmacia), dos veces de purificación en Q-sefarosa Fast Flow (Messrs. Pharmacia) con la siguiente hidroxipatita-cromatografía (Bio-Rad). Para este propósito, el lisado obtenido después de la centrifugación se aplicó directamente a una columna de Butil-Sefarosa equilibrada con 50 mM de TEA, MgCl₂ 1 mM, sulfuro de amonio 1M, pH = 7,0, y se eluyó con un gradiente de sal lineal decreciente. Al hacerlo, la
40 oxidoreductasa se eluyó a 0,2 a 0,3 M de sulfato de amonio. Las fracciones que contienen oxidoreductasa se combinaron y se concentraron a un volumen apropiado por medio de ultrafiltración (límite de exclusión 10 kDa). Posteriormente, las fracciones de oxidoreductasa que se habían concentrado se reprocesaron y se purificaron adicionalmente mediante Q-sefarosa, usando solución reguladora de Kaliumphosphate 50 mM con MgCl₂ 1 mM y NaCl 1M. La enzima se eluyó por consiguiente con NaCl 0,7-0,8 M. Posteriormente, las fracciones activas se
45 concentraron y se equilibraron con solución reguladora Kaliumphosphate 10 mM, pH 7,0, MgCl₂ 1 mM y se aplicaron sobre la columna de hidroxipatita y se eluyeron con solución reguladora de Kaliumphosphate 200 mM, MgCl₂ 1 mM. La siguiente tabla resume los resultados obtenidos.

TABLA

Etapa de purificación	Concentración de proteína	Proteína total (mg)	Actividad total	Actividad específica
Lisado celular	8,9	89	250	2,8
Butil-sefarosa	5	7,5	115	15

Q-sefarosa	1,4	1,68	58	34
Hidroxiapatita	0,5	0,25	23	92

5 La determinación de la cantidad desde proteína se realizó según Lowry et al. Journal of Biological Chemistry, 193 (1951): 265 - 275 o Peterson et al., Analytical Biochemistry, 100 (1979): 201 - 220). El cociente entre la actividad de la enzima y la cantidad desde proteína produce la actividad específica, en la que la conversión de 1 μ mol por minuto corresponde a 1 unidad (U).

Ejemplo 2

Determinación de la secuencia N-terminal de la oxidoreductasa según la invención

10 Después de la etapa de purificación de columna de hidroxiapatita, la preparación de enzima según el ejemplo 1 se fraccionó en un gel de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10 % y se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (membrana de PVDF).

La banda claramente visible a aproximadamente 30 kDa se sometió a secuenciación N-terminal mediante degradación de Edman (Procise 492 (PE-Biosystems)) y a la secuenciación del péptido interno prominente. Se obtuvo la siguiente secuencia N-terminal:

TRTVVVTGAGSGIGR

15 Secuencia de péptido interno:

LEQADDVAR

Ejemplo 3

a) Clonación de la Oxidoreductasa de *Mycobacterium vanbaalenii*

20 Se usó ADN genómico aislado de las células de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 como plantilla para la reacción de PCR con cebadores degenerados diseñados en base a las secuencias de fragmentos de proteínas de la degradación de Edman. Al hacerlo, la amplificación se llevó a cabo en una solución reguladora de PCR [(NH₄)₂SO₄ 16 mM; Tris-HCl 67 mM, pH 8,3 (a 25 °C); MgCl₂ 1,5 mM; 0,01 % de Tween 20; Mezcla dNTP 0,2 mM; en cada caso 30 pMol de cebador y 1,25 U de BioTherm Star Polymerase (Genecraft)] con 50 ng de ADN genómico como plantilla.

Ciclo 1: 95 °C, 7 min

25 Ciclo 2 x 28: 94 °C, 40 s

La caída de temperatura comienza a 63 °C -0,5 °C/etapa, 30 s

68 °C, 60 s

Ciclo 3 x 20: 94 °C, 40 s

53 °C, 40 s

30 72 °C, 60 s

Ciclo 4: 70 °C, 7 min

4 °C, [infinito]

35 Después del fraccionamiento de todo el lote de PCR en el gel de agarosa al 1 %, se identificó una banda de aproximadamente 650 y se clonó a través de unidades estructurales de adenosina en un vector Topo-TA (Invitrogen) para la determinación de la secuencia de ADN.

La banda de ADN resultante de la reacción de selección mostró un marco de lectura abierto correspondiente al fragmento de una oxidoreductasa de 227 residuos de aminoácidos.

La determinación de la secuencia completa que codifica la oxidoreductasa se realizó mediante el procedimiento de PCR invertida (iPCR).

40 La secuencia del gen que codifica la oxidoreductasa incluía 771 pares de bases y era equivalente a una longitud de 256 residuos de aminoácidos.

b) Síntesis de una codificación de fragmentos de ADN de longitud completa para una ADH de cadena corta de *Mycobacterium vanbaalenii* mediante PCR

Se construyeron cebadores específicos para la clonación posterior del transcrito de longitud completa en los sistemas de expresión apropiados. Al hacerlo, se modificaron un cebador 5' con una secuencia de reconocimiento para Nde I y un cebador 3' con una secuencia de reconocimiento para Hind III. El ADN genómico aislado de las células de *Mycobacterium vanbaalenii* sirvió como plantilla para la reacción en cadena de la polimerasa. La amplificación se llevó a cabo en una solución reguladora de PCR [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0); KCl 50 mM; 10 mM de MgSO₄; Mezcla dNTP 1 mM; en cada caso 20 pMol de cebador y 2,5 U de polimerasa de ADN Platinum Pfx (Invitrogen)] con 50 ng de plantilla y los siguientes ciclos de temperatura:

10 Ciclo 1: 94 °C, 2 minutos

Ciclo 2 x 30: 94 °C, 15 s

58 °C, 30 s

68 °C, 75 s

Ciclo 3: 68 °C, 7 min

15 4 °C, [infinito]

El producto de PCR resultante se restringió después de la purificación sobre un gel de agarosa al 1 % con la ayuda de las endonucleasas Nde I y Hind III y se ligó en el esqueleto del vector pET21a (Novagen), cuyo esqueleto se había tratado con las mismas endonucleasas. Después de transformar 2 [mu]l del lote de unión en células *E. coli* Top 10 F' (Invitrogen), se analizaron los ADN plásmidos de colonias resistentes a ampicilina (o kanamicina) para detectar la presencia de un inserto que tiene un tamaño de 750 por medio de un análisis de restricción con las endonucleasas Nde I y Hind. La construcción de expresión pET21-Myc fue secuenciada. El gen de *Mycobacterium vanbaalenii* que codifica una oxidorreductasa de cadena corta tenía un marco de lectura abierto de un total de 771 mediante (SEQ ID No: 2), que correspondía a una proteína de 256 aminoácidos (SEQ ID No: 1).

Ejemplo 4.

25 Expresión de oxidorreductasa recombinante en Células de *E. Coli*

Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* Star BL21 (De3) (Invitrogen) con las construcciones de expresión pET21-MIX que codifican la oxidorreductasa. Las células de *Escherichia coli* transformadas con las construcciones de expresión se cultivaron luego en 200 ml de medio LB (1 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 1 % de NaCl) con 50 µg/ml de ampicilina o 40 µg/ml de kanamicina, respectivamente, hasta que densidad óptica de 0,5, medida a 550 nm, se alcanzó. La expresión de la proteína recombinante se indujo añadiendo isopropiltiogalactósido (IPTG) con una concentración de 0,1 mM. Después de 16 horas de inducción a 25°C y 220 rpm, las células se recogieron y congelaron a -20°C. Para la prueba de actividad, se mezclaron 10 mg de células con 500 µl de solución reguladora TEA 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 1 mM y 500 µl de perlas de vidrio y se rompieron durante 10 minutos usando un molino de vidrio. El lisado obtenido se usó luego en un estado diluido para las mediciones respectivas.

La prueba de actividad se realizó de la siguiente manera: 870 µl de solución reguladora de TEA 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 1 mM, 160 µg de NADH, 10 µl de lisado celular diluido. La reacción se inició añadiendo 100 µl de una solución de sustrato 100 mM a la mezcla de reacción.

40 Para la recuperación de enzimas en grandes cantidades, se resuspendieron 30 g de células en 150 ml de solución reguladora de trietanolamina (TEA) (100 mM, pH 7, MgCl₂ 2 mM, glicerol al 10 %) y se rompieron usando un homogeneizador de alta presión. Posteriormente, la solución de enzima se mezcló con 150 ml de glicerol y se almacenó a -20° C.

Ejemplo 5

Determinación de la actividad oxidorreductasa para la reducción de quinuclidin-3-ona por ensayo fotométrico.

45 La actividad de las enzimas preparadas como se describe en el ejemplo 4 se determinó como actividad de oxidación de 1 µmol de NADH a NAD en un minuto añadiendo el sustrato 3-quinuclidinona (10 mM), una coenzima NADH (0,25 mM) a los 10 µl de solución de enzima en 1 ml de solución reguladora de TEA 100 mM, pH 7,0 suplementado con MgCl₂ 1 mM. La velocidad de disminución de la absorbancia a 340 nm por minuto dividida mediante el coeficiente de absorbancia para NADH (6,22 M⁻¹ cm⁻¹) es proporcional a la actividad de la enzima (U) para la reducción de quinuclidin-3-ona al correspondiente alcohol.

Oxidorreductasa:	Actividad (U/g de peso)
------------------	-------------------------

	húmedo)
SEQ ID NO: 1	9000 U/g
SEQ ID NO:3	281 U/g
SEQ ID NO:5	1088 U/g
SEQ ID NO:7	413 U/g
SEQ ID NO:9	5000 U/g

Ejemplo 6

Caracterización de oxidoreductasas con respecto a las propiedades de reducción de quinuclidin-3-ona

5 Las oxidorreductasas de las secuencias polipeptídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:9 se examinaron para la determinación de la enantioselectividad y el valor de conversión por la reducción de quinuclidin-3-ona al alcohol correspondiente mediante el siguiente procedimiento:

10 Escherichia coli recombinante que porta los genes de las oxidorreductasas de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:9 se cultivaron como se describe en el ejemplo 4. 18 h después de la inducción, se resuspendieron 2 g de cada cepa recombinante en 10 ml de solución reguladora de trietanolamina 100 mM, pH 7,0 suplementado con MgCl₂ 2 mM y se rompió usando el molino de vidrio durante 10 min. La solución de enzima resultante se clarificó por centrifugación y se mezcló con un volumen igual de glicerol. Para la configuración de la reacción, se usaron 56 µl de solución de enzima para la conversión de 75 mg de quinuclidin-3-ona añadiendo 0,15 mg de NAD, 75 µl (10 %) de Oxidoreductasa aus Pichia capsulata, 250 µl de Metil-2-pentanol y 119 µl de TEA 100 mM pH 6,5 suplementado con MgCl₂ 2 mM. Después de 24 h de incubación de las muestras a 30 °C, se añadieron 10 µl de la reacción a 1 ml de MeOH y se analizó por GC. Para la detección de los enantiómeros, se usó la columna Hydrodex β-6TBDM (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm) de Masherey-Nagel (Alemania).

SEQ No:	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:9
Ee (%)	> 99	> 95	> 95	> 95	> 95
Conversión (%)	100	> 78	> 81	66	> 84

Ejemplo 7

20 Conversión de quinuclidin-3-ona en el correspondiente (R)-3-quinuclidinol en una escala de 10 ml con Metil-2-pentanol como cosustrato

25 Se cultivó Escherichia coli recombinante que porta el gen de oxidorreductasa de la SEQ ID NO: 1 como se describe en el ejemplo 4. 18 horas después de la inducción, se resuspendieron 30 g de células cosechadas en 100 ml de solución reguladora de trietanolamina (TEA) 100 mM, pH 7,0 suplementado con MgCl₂ 2 mM e interrumpido con prensa francesa. El lisado obtenido se clarificó por centrifugación a 6000 g durante 10 minutos a 4° C. Para la reducción de 1,5 g de 3-quinuclidinona, se añadieron 250 µl de solución de enzima (1125 U) a los 4,05 ml de solución reguladora de TEA 100 mM, pH 6,5 suplementado con MgCl₂ 2 mM, 3 mg de NAD, 225 U de alcohol deshidrogenasa de Pichia capsulata y 5 ml de metil-2-pentanol. La reacción se incubó bajo agitación a 30°C. Después de 21 horas, la reacción se detuvo mediante la adición de 3 ml de NaOH 5 M, 5 ml de metanol y se analizó por cromatografía de gases. La tasa de conversión medida a (R)-3-quinuclidinol fue del 98 % con una pureza óptica del producto de > 99 %.

Ejemplo 8

Conversión de quinuclidin-3-ona en el correspondiente (R)-3-quinuclidinol en una escala de 10 ml con Isopropanol como cosustrato

35 Se cultivó Escherichia coli recombinante que porta el gen de oxidorreductasa de la SEQ ID NO: 1 como se describe en el ejemplo 4. 18 horas después de la inducción se resuspendieron 30 g de células cosechadas en 100 ml de solución reguladora de trietanolamina (TEA) 100 mM, pH 7,0 suplementado con MgCl₂ 2 mM e interrumpido con prensa francesa. Para la reducción de 1,5 g de quinuclidin-3-ona se añadieron 525 U de enzima a 5,25 ml de solución reguladora de TEA 100 mM, pH 7,0 suplementado con ZnCl₂ 1 mM, 1,5 mg de NAD, 525 U de Alcohol Deshidrogenasa de Candida nemodendra (WO2007012428, SEQ ID NO: 8) y 1 ml de isopropanol. La reacción se incubó bajo agitación a 30° C. Después de 24 h de incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de 3 ml de

NaOH 5 M, 5 ml de metanol y se analizó mediante cromatografía de gases. La velocidad de conversión medida a (R)-3-quinuclidinol fue del 100 % con una pureza óptica del producto de > 99 %.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Cambrex IEP GmbH
- 5 <120> Procedimiento biocatalítico de producción de (R) -3-Quinuclidinol
- <130> MB
- <160> 10
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 10 <211> 256
- <212> PRT
- <213> Mycobacterium vanbaalenii
- <400> 1

Met Thr Arg Thr Val Val Val Thr Gly Ala Gly Ser Gly Ile Gly Arg
 1 5 10 15

Ala Ile Ala Asn Thr Leu Ala Gln Arg Asn Trp Arg Val Val Val Thr
 20 25 30

Asp Val Asn Ala Ala Ala Ala Ser Glu Val Ala Ala Ala Leu Pro Asn
 35 40 45

Pro Pro Ala Gly His Glu Ser Ala Gln Leu Asp Val Thr Ser Pro Glu
 50 55 60

Asn Ala Ala Ala Val Ala Ser Asp Val Ser Glu Arg Leu Gly Leu Asp
 65 70 75 80

Ala Trp Val Ser Asn Ala Gly Ile Ser Phe Met Arg Arg Phe Leu Asp
 85 90 95

Ala Pro Ile Glu Arg Tyr Glu Gln Thr Met Asp Val Asn Leu Lys Gly
 100 105 110

Val Phe Val Cys Gly Gln Ala Ala Ala Arg Glu Met Val Arg Ala Gly
 115 120 125

Ile Pro Gly Met Ile Val Asn Thr Ala Ser Met Ala Gly Lys Gln Gly
 130 135 140

Arg Val Pro Phe Leu Ser Asp Tyr Val Ala Ser Lys Phe Gly Val Val
 145 150 155 160

Gly Leu Thr Gln Ala Met Ala Tyr Glu Leu Gly Glu His Gly Ile Thr
 165 170 175

Val	Asn	Cys	Val	Cys	Pro	Gly	Phe	Val	Glu	Thr	Pro	Met	Gln	Ser	Arg
			180					185					190		
Glu	Leu	Gln	Trp	Glu	Ala	Glu	Leu	Arg	Gly	Thr	Thr	Pro	Asp	Gly	Val
		195					200					205			
Arg	Ala	Met	Met	Ile	Ala	Asp	Thr	Pro	Leu	Gly	Arg	Leu	Glu	Gln	Ala
	210					215					220				
Asp	Asp	Val	Ala	Arg	Ala	Val	Ala	Phe	Leu	Leu	Ser	Asp	Asp	Ala	Arg
225					230					235					240
Phe	Ile	Thr	Gly	Glu	Ala	Leu	Ala	Val	Asn	Gly	Gly	Ala	Tyr	Met	Asp
				245					250					255	

<210> 2

<211> 771

<212> ADN

5 <213> Mycobacterium vanbaalenii

<400> 2

```

atgacgagaa ctgtggtcgt gaccggagcg ggatccggtg tcggacgagc gatcgccaac      60
aactggcgcc aacgaaattg gcgggtggtg gtcaccgacg tcaatgccgc cgccgcaagc      120
gaggtcgcag cggcactgcc gaatccgccc gcaggccatg aatccgcaca actggacgtc      180
acctcccccg agaacgcggc cgccgtggca tccgacgtct cggagcggct cgggctcgac      240
gcgtgggtga gcaacgccgg catctcgttc atgcgccgct tcctcgacgc ccccatcgag      300
cgctacgagc agaccatgga cgtgaatctc aagggcgtgt tcgtgtgctg gcaggccgcg      360
gcgcgggaga tggtgcgcgc cggcattccc gggatgatcg tgaacaccgc ctcgatggcg      420
ggcaagcagg gccgggtgcc gttcctgtcg gactacgtcg cctcgaaatt cggggtggtc      480
gggttgacct aggcgatggc ctacgaactc ggcgagcatg gcatcacagt caactgcgtg      540
tgccctggct ttgtcgaaac ccccatgcag tcaaggaat tgcaagtggga ggccgagctg      600
cgtggcacca cccccgacgg tgtccgcgcc atgatgatcg ccgacacgcc gctgggtcgc      660
cttgagcagg ccgacgacgt cgcccgcgcc gtggccttcc tgctctccga cgacgccctg      720
ttcatcaccg gcgaagcgtc cgccgtcaac ggcgggcgct acatggactg a      771

```

<210> 3

<211> 264

10 <212> PRT

<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 3

Met	Ser	Thr	Pro	Ala	Asn	Ser	Thr	Pro	Asp	Thr	Pro	Ser	Thr	Val	Val
1				5					10					15	

ES 2 682 031 T3

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

Ala Glu Arg Gly Trp Arg Val Val Ala Thr Asp Val Asp Val Ala Ala
 35 40 45

Ala Asp Glu Thr Ala Ser Ser Leu Ser Gly Ser Gly His Glu Ser Ala
 50 55 60

Arg Leu Asp Val Thr Asp Pro Ala Gln Ala Ser Ala Leu Ala Asp Asp
 65 70 75 80

Val Ala Asp Arg Ile Gly Leu Gly Ala Trp Val Ser Asn Ala Gly Ile
 85 90 95

Ser Ala Met Ala His Phe Val Asp Ile Ser Ala Glu Gln Leu Asp Arg
 100 105 110

Ser Leu Asp Val Asn Leu Lys Gly Val Phe Phe Cys Gly Gln Ala Ala
 115 120 125

Ala Arg Ala Met Ile Arg Thr Gly Val Arg Gly Thr Ile Val Asn Thr
 130 135 140

Ala Ser Met Ala Ala Lys Gln Gly Arg Val Pro Phe Leu Ala Asp Tyr
 145 150 155 160

Val Ala Ser Lys Phe Gly Val Leu Gly Leu Thr Gln Ala Met Ala Phe
 165 170 175

Glu Leu Ala Ala His Gly Ile Thr Val Asn Ser Val Cys Pro Gly Phe
 180 185 190

Val Ala Thr Pro Met Gln Thr Arg Glu Leu Glu Trp Glu Ala Lys Leu
 195 200 205

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

Pro Leu Gly Arg Leu Gln Thr Pro Asp Asp Val Ala Arg Ala Val Ala
 225 230 235 240

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

Val Asn Gly Gly Ala Tyr Met Asp
 260

<210> 4

<211> 795

ES 2 682 031 T3

<212> ADN

<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 4

```

atgagcacc cgcggaacag cactcccagac acccccagca ccgtcgtcgt caccggcgcc      60
ggatccggca tcggccgcg gatcgccacc acgtcgcgag aacgcggctg gcgtgtggtc      120
gccaccgacg tcgacgtcgc cgcggccgac gagacggcct catccctgag cggcagcggc      180
cacgagtcgg cgcgtctcga cgtcaccgat cccgcgcagg cgtccgcaact ggccgacgac      240
gtcgcggacc gcatcgggct gggggcctgg gtcagcaacg cgggcatctc cgcgatggcg      300
cacttcgtcg acatctccgc cgaacaactc gaccgcagtc tcgacgtcaa cctcaagggc      360
gtgtttctct gtggtcaggc cgcggcccgc gccatgatcc gcaccggtgt gcgcggcacg      420
atcgtcaaca ccgcatcgat ggcggcaaag cagggccggg taccgttcct cgcggactat      480
gtcgcgtcca agttcggcgt gctgggactc acccaggcga tggccttcga acttgccgca      540
cacggcatca cggtaaacag tgtctgcccc ggtttcgtgg caacaccgat gcagacacga      600
gaattggagt gggaggcgaa actcagcggc tcgacgcccg acggcgtacg ccagtcctgg      660
atcgacgcca cggcgtggg ccgctgcaa actcccagc acgtcgcgag cgcggtggcg      720
ttcctggtct ccgaagatgc ccgcttcac accggagagg cgctgtcggg caacggcggt      780
gcctacatgg actga                                                                795
    
```

5 <210> 5

<211> 259

<212> PRT

<213> Caldilinea aerophila

<400> 5

```

Met Arg Leu Arg Gly Lys Ile Ile Gly Ile Thr Gly Ala Gly Ser Gly
 1          5          10          15

Ile Gly Lys Ala Ala Ala Leu Ala Leu Ala Arg Glu Gly Ala Ala Leu
 20          25          30

Ala Val Thr Asp Phe Asn Leu Asp Trp Ala Gln Gln Thr Ala Ala Asp
 35          40          45

Ile Arg Ser Gln Gly Gly Glu Ala Thr Ala Trp Arg Leu Asp Val Thr
 50          55          60

Asp Gln Ala Glu Ala Glu Arg Val Leu Gln Ala Leu Ile Asp Arg Tyr
 65          70          75          80
    
```

10

ES 2 682 031 T3

Gly Arg Leu Asp Val Trp Val Asn Asn Ala Gly Val Ser Thr Met Asn
85 90 95

Arg Phe Val Asp Leu Thr Glu Arg Asp Trp Asp Tyr Asn Met Asn Val
100 105 110

Asn Ala Lys Gly Val Phe Leu Cys Ser Gln Val Ala Ala Arg Arg Met
115 120 125

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

~~Lys Arg Gly Asn Ala Pro Phe Leu Ala His Tyr Val Ala Ser Lys Phe~~
145 150 155 160

Ala Val Ile Gly Leu Thr Gln Ala Met Ala Gly Glu Leu Ala Pro Tyr
165 170 175

His Ile Thr Val Asn Ala Val Cys Pro Gly Tyr Val Arg Thr Ser Met
180 185 190

Gln Glu Arg Glu Val Glu Trp Glu Ala Met Leu Arg Gly Val Thr Pro
195 200 205

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

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

Asp Ala Asp Phe Ile Thr Gly Glu Ala Ile Asn Val Asn Gly Gly Ala
245 250 255

Trp Met Asp

<210> 6

<211> 780

5 <212> ADN

<213> *Caldilinea aerophila*

<400> 6

ES 2 682 031 T3

atgcgactca ggggcaaaat ttcggcatc accggcgctg gttcaggcat tggcaaggcg	60
gcggctctag cgctggcgcg ggagggcgcc gcattggccg tgacggactt caacctggat	120
tggcgcgagc aaacagccgc agacatccgc agccagggcg gcgagggcgac agcatggcgg	180
cttgacgtga ccgaccaggc cgaggcagag cgcgtgctgc aggcgctgat cgaccgttac	240
ggccggctcg acgtctgggt gaacaacgca ggcgtctcga ccatgaaccg ctttgttgac	300
ctcactgagc gggactggga ctataacatg aacgtcaacg ccaaaggcgt ttttctctgc	360
agccaggctg ccgcccgacg catgatcgcc caaggaggctg ggaagatcat caacgtcgcc	420
tccatggcag gcaaacgagg caacgcacct ttcttggtc attatgttgc cagcaaattt	480
gctgtaatcg ggctgacgca agcgatggcg ggcgaactgg cgccttatca catcacctc	540
aacgccgttt gccctggcta tgtgcgaca tctatgcaag agcgagaggt ggagtgggag	600
gcaatgctgc gtggggttac acccgaagcg gtgcgacaac tgtatatcca ggatacacct	660
ctgcgacgcc tcgaaacacc cgaagatgtg gcgaaagtca ttgttttct tgcttcagag	720
gacgcagact tcatcacggg cgaagcgatt aacgtcaacg gcggcgctg gatggattaa	780

<210> 7

<211> 266

5 <212> PRT

<213> Starkea novella

<400> 7

ES 2 682 031 T3

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

Arg Leu Ala Phe Val Thr Gly Ala Ala Thr Gly Ile Gly Arg Ala Ile
 20 25 30

Ala Thr Ala Leu Ala Arg Gln Gly Val Arg Val Ala Ile Gly Asp Ile
 35 40 45

Asn Leu Gly Ala Ala Glu Asp Ala Ala Ala Ala Ile Gly Gly Gly Ala
 50 55 60

Val Ala Val Glu Val Asp Val Arg Arg Arg Ala Ser Val Glu Ala Ala
 65 70 75 80

Phe Ala Arg Val Leu Glu Leu Leu Gly Gly Cys Asp Leu Leu Val Ala
 85 90 95

Asn Ala Gly Val Ser Thr Met Gln Ala Ala Leu Glu Ile Thr Asp Gln
 100 105 110

Glu Trp Asp Phe Asn Phe Asp Val Asn Thr Arg Gly Val Phe Leu Thr
 115 120 125

Asn Gln Ile Val Ala Arg His Phe Val Ala Thr Gly Lys Gly Cys Ile
 130 135 140

Val Asn Thr Ala Ser Leu Ala Ala Lys Val Gly Ala Pro Leu Leu Ala

ES 2 682 031 T3

145					150						155				160
His	Tyr	Ser	Ala	Ser	Lys	Phe	Ala	Val	Leu	Gly	Trp	Thr	Gln	Ala	Leu
				165					170						175
Ala	Arg	Glu	Leu	Ala	Pro	Lys	Gly	Ile	Arg	Val	Asn	Ala	Val	Cys	Pro
			180					185					190		
Gly	Phe	Val	Ala	Thr	Gly	Met	Gln	Ser	Arg	Glu	Val	Gln	Trp	Glu	Ala
		195					200					205			
Thr	Leu	Arg	Gly	Val	Thr	Pro	Gln	Arg	Val	Ile	Asp	Asp	Tyr	Ile	Ala
	210					215					220				
Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Arg	Leu	Glu	Gln	Pro	Glu	Asp	Val	Ala	Asp	Val
225					230					235					240
Val	Val	Phe	Leu	Cys	Ser	Glu	Gln	Ala	Arg	Phe	Met	Thr	Gly	Gln	Gly
				245					250					255	
Val	Asn	Val	Thr	Gly	Gly	Val	Tyr	Thr	Thr						
			260					265							

<210> 8

<211> 801

<212> ADN

5 <213> Starkea novella

<400> 8

ES 2 682 031 T3

atgatccccg cgaccgcccc gacgcccgtc taccgccaac tttccggccg gctggccttc	60
gtgacggggg cggcgacggg catcgggagt gccatcgcca cggctctggc gcgccagggc	120
gtgcgggtcg cgatcggcga catcaatctc ggcgcggccg aggacgcggc ggcggcgatc	180
ggcggcggtg ccgtggcggg cgaggaggat gtgcgccggc ggcctccgt cgaggcggcg	240
ttcggccgcg tgctggagtt gctcggcggc tgcgacctgc tggtcgcaa tgccggcgtc	300
tcgaccatgc agggggcgct cgagatcacc gaccaggagt gggacttcaa cttcgacgtc	360
aacaccgcg gcgtgttctt caccaaccag atcgtcgccc ggcatttcgt ggcgaccggc	420
aagggctgca tcgtcaacac cgcctcgctc gccgccaaagg tcggggcgcc gctgctggcg	480
cattactcgg cctccaaatt cgcctcctc ggctggacgc aggcgctggc ccgcgagctc	540
gcccccaagg gcatccgcgt caatgccgtc tgcccgggt tcgtggcgac cggcatgcag	600
tcgcgcgagg tcgagtggga ggcgacgctg cgcggcgtga ccccgacgcg cgtgatcgac	660
gactacatcg cccagacccc gctcggccgg ctggagcagc cggaggacgt cgcggcgtg	720
gtggtgttcc tgtgctcgga gcaggccgc ttcatgaccg ggcagggcgt caacgtcacc	780
 ggcggcgtct acacgacctg a	 801

<210> 9

<211> 264

<212> PRT

5 <213> Oceanithermus profundus

<400> 9

Met Leu Glu Lys Arg Thr Ala Leu Ile Thr Gly Ala Gly Gly Gly Ile
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Val Ala His Arg Leu Ala Arg Glu Gly Ala Lys Val Trp
 20 25 30

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

Arg Glu Ala Gly Gly Arg Ala Arg Ala Arg Arg Val Asp Val Thr Arg
 50 55 60

Arg Glu Glu Leu Glu Ala Ala Cys Ala Ala Ala Tyr Ala Glu Asp Gly
 65 70 75 80

Arg Val Asp Leu Val Val Ala Asn Ala Gly Val Ser Thr Met Arg Pro
 85 90 95

Phe Leu Glu Leu Thr Asp Glu Asp Trp Ala Phe Asn Phe Asp Val Asn
 100 105 110

Ala Arg Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Gln Thr Phe Ala Arg Arg Met Lys
 115 120 125

Asp Gln Ala Pro Met Pro Gly Ser Ser Leu Arg Gly Lys Leu Ile Ala
 130 135 140

Val Ala Ser Met Ala Ala Arg Gln Ala Ala Pro Trp Leu Ala His Tyr
 145 150 155 160

Ser Ala Ser Lys Phe Ala Val Leu Gly Leu Val Gln Ala Ala Ala Lys
 165 170 175

Glu Leu Ala Pro Phe Arg Ile Thr Val Asn Ala Val Asn Pro Gly Phe
 180 185 190

Val Lys Thr Ser Met Gln Glu Arg Glu Ile Ala Trp Glu Ala Arg Leu
 195 200 205

Arg Gly Thr Thr Pro Glu Ala Val Val Ala Asp Tyr Leu Ala Gln Thr

ES 2 682 031 T3

210		215		220											
Pro	Leu	Gly	Arg	Leu	Glu	Arg	Pro	Glu	Asp	Val	Ala	Gly	Val	Val	Ala
225					230					235					240
Phe	Leu	Ala	Gly	Pro	Asp	Ala	Asp	Phe	Ile	Thr	Gly	Glu	Ala	Val	Glu
				245					250					255	
Val	Asn	Gly	Gly	Ala	Trp	Ile	Phe								
			260												

<210> 10

<211> 795

<212> ADN

5 <213> Oceanithermus profundus

<400> 10

atgcttgaga	aaagaacggc	actgatcacc	ggcgccggcg	gcgccatcgg	cgccgccgtg	60
gcccaccggc	tcgcgcgca	aggcgccaag	gtctgggtca	cgaccgcga	cctcgacgcc	120
gcgaggcga	cgcccgccg	catccgggag	gcgggcgggc	gcccgcgcg	gcgccgctg	180
gacgtcacc	gccgggaaga	gctcgaggcc	gcctgcgcag	cgccctacgc	cgaggacggg	240
cgcgtcgacc	tggtggtggc	gaacgcccgc	gtgagcacga	tcgccccctt	cctggagctg	300
accgacgagg	actgggctt	caacttcgac	gtcaacgcc	gcgggacctt	ctacacctg	360
cagaccttcg	cccggcgcat	gaaggaccag	gcccgatgc	cggaagctc	gctgcggggg	420
aagctgatcg	ccgtggccag	catggcggcg	cgccaggcgg	ccccctggct	ggcccactac	480
tccgctcga	agttcgcggt	gctggggctg	gtgcaggcgg	cgccgaagga	gctcgccccc	540
ttccgatca	ccgtcaacgc	ggtgaacctg	ggcttcgtca	agacctgat	gcaggaacgc	600
gaaatgcct	gggaggcgcg	gctgcggggc	accaccccg	aggcggctcg	cgccgactac	660
ctggcccaga	ccccgtggg	acggtggaa	aggccggagg	acgtcgccgg	cgtggtggct	720
ttcctggccg	gccccgacgc	cgacttcac	accggcgagg	ccgtggagg	gaacggcggg	780
gcctggatct	tctga					795

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de (R)-3-quinuclidinol o una sal del mismo por reducción de quinuclidin-3-ona con cofactor y oxidorreductasa, **caracterizado porque** la oxidorreductasa comprende un motivo de secuencia de aminoácidos MQX₁REX₂X₃WEA, en el que cada uno de X₁, X₂, X₃ son cualquiera de los residuos de aminoácidos A (Ala), R (Arg), N (Asn), D (Asp), C (Cys), Q (Gln), E (Glu), G (Gly), H (His), I (Ile), L (Leu), K (Lys), M (Met), F (Phe), P (Pro), S (Ser), T (Thr), W (Trp), Y (Tyr) o V (Val), y **porque** la oxidorreductasa se selecciona de
- 5 a) polipéptidos con una secuencia de aminoácidos, en la que al menos el 65 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3; o
- 10 b) polipéptidos con una secuencia de aminoácidos, en la que al menos el 75 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de la SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:9; o
- c) polipéptidos con una secuencia de aminoácidos, en la que al menos el 85 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de la SEQ ID NO:7.
2. Procedimiento de producción de (R)-3-quinuclidinol o una de sus sales por reducción de quinuclidin-3-ona con cofactor y oxidorreductasa, **caracterizado porque** la oxidorreductasa comprende un motivo de secuencia de aminoácidos MQX₁REX₂X₃WEA, en el que cada uno de X₁, X₂, X₃ son cualquiera de los residuos de aminoácidos A (Ala), R (Arg), N (Asn), D (Asp), C (Cys), Q (Gln), E (Glu), G (Gly), H (His), I (Ile), L (Leu), K (Lys), M (Met), F (Phe), P (Pro), S (Ser), T (Thr), W (Trp), Y (Tyr) o V (Val), y **porque** la oxidorreductasa se selecciona de
- 15 a) polipéptidos con una secuencia de aminoácidos derivada de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 a través de la sustitución, eliminación o adición de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, veintiséis o veintisiete a cuarenta residuos de aminoácidos, que son capaces de reducir la quinuclidin-3-ona; o
- 20 b) polipéptidos que están codificados por un polinucleótido con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10 de la lista de secuencias; o
- 25 c) polipéptidos que están codificados por un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que hibrida con el complemento de longitud completa de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10 en condiciones rigurosas, en el que condiciones rigurosas comprenden hibridación en solución de NaCl 0,7-1 M a 60 °C y lavado en una solución de SSC de 0,1 a 2 veces a 65 °C, y se entiende que una solución de SSC de 1 vez es una mezcla que consiste en NaCl 150
- 30 mM y citrato de sodio 15 mM.
3. Procedimiento de producción de (R)-3-quinuclidinol o una de sus sales por reducción de quinuclidin-3-ona con cofactor y oxidorreductasa, **caracterizado porque** la oxidorreductasa comprende un motivo de secuencia de aminoácidos MQX₁REX₂X₃WEA, en el que cada uno de X₁, X₂, X₃ son cualquiera de los residuos de aminoácidos A (Ala), R (Arg), N (Asn), D (Asp), C (Cys), Q (Gln), E (Glu), G (Gly), H (His), I (Ile), L (Leu), K (Lys), M (Met), F (Phe), P (Pro), S (Ser), T (Thr), W (Trp), Y (Tyr) o V (Val), y **porque** la oxidorreductasa se selecciona de
- 35 polipéptidos con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9 de la lista de secuencias.
4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el cofactor se regenera continuamente con un cosustrato.
- 40 5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** se usa NADH o NADPH como cofactor.
6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** se usa 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-heptanol o 2-octanol como cosustrato o como un alcohol secundario, respectivamente.
- 45 7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el alcohol secundario como cosustrato se usa en una cantidad desde 5 a 70 % en volumen en base al volumen total de los lotes de reacción.
8. Un procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado porque** el alcohol secundario como cosustrato se usa en una cantidad desde 5 a 50 % en volumen en base al volumen total de los lotes de reacción.
- 50 9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el alcohol secundario usado como cosustrato es inmiscible en agua y se usa en una cantidad desde 5 a 80 % en volumen en base al volumen total de los lotes de reacción.

10. Un procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado porque** el alcohol secundario usado como cosustrato es inmiscible en agua y se usa en una cantidad desde 20 a 80 % en volumen en base al volumen total de los lotes de reacción.
- 5 11. Un procedimiento según la reivindicación 9 o 10, **caracterizado porque** el alcohol secundario usado como cosustrato es metil-2-pentanol.
12. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** la quinuclidin-3-ona se usa en una cantidad desde 5 a 50 % en peso, en base al volumen de reacción total.
13. Un procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado porque** la quinuclidin-3-ona se usa en una cantidad desde 8-40 % en peso en base al volumen de reacción total.
- 10 14. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado porque** el número de renovación total TTN (= mol de quinuclidin-3-ona reducido por mol de cofactor) es $> 10^3$.
15. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado porque** se lleva a cabo en un sistema acuoso orgánico de dos fases.
- 15 16. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque**, además, se usa un solvente orgánico.
17. Un procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado porque** se usa éter dietílico, tert-butil metil éter, diisopropil éter, dibutil éter, acetato de etilo, acetato de butilo, heptano, hexano o ciclohexano como solvente orgánico.
- 20 18. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado porque** se añade una oxidoreductasa adicional en la reacción para la regeneración del cofactor.