

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 579**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/10** (2006.01)  
**C12N 15/54** (2006.01)  
**C12P 17/12** (2006.01)  
**C12P 13/00** (2006.01)  
**C12R 1/66** (2006.01)  
**C12R 1/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2014 PCT/CN2014/090080**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015 WO15078267**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2014 E 14865656 (4)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3075847**

54 Título: **Transaminasa y utilización de la misma**

30 Prioridad:

**26.11.2013 CN 201310611503**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.12.2019**

73 Titular/es:

**ASYMCHEM LABORATORIES (TIANJIN) CO., LTD (20.0%)  
 No. 6 Dongting 3rd Street, TEDA  
 Tianjin 300457, CN;  
 ASYMCHEM LIFE SCIENCE (TIANJIN) CO., LTD (20.0%);  
 TIANJIN ASYMCHEM PHARMACEUTICAL CO., LTD (20.0%);  
 ASYMCHEM LABORATORIES (FUXIN) CO., LTD (20.0%) y  
 JILIN ASYMCHEM LABORATORIES CO., LTD (20.0%)**

72 Inventor/es:

**HONG, HAO;  
 GAO, FENG;  
 LI, YANJUN;  
 ZHANG, YAN y  
 LI, SHAOHE**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 734 579 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

Transaminasa y utilización de la misma.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la síntesis de compuestos quirales, y particularmente a una transaminasa, y a sus utilizaciones.

10 **Antecedentes de la invención**

Las aminas quirales son de naturaleza ubicua. Son unidades estructurales habituales en muchas moléculas bioactivas importantes, tanto de origen sintético como natural. Las aminas quirales son un motivo estructural habitual en muchos fármacos. Muchas aminas quirales son también auxiliares quirales y selectores quirales importantes. Por lo tanto, la preparación de aminas quirales es de importancia económica significativa.

Actualmente, las aminas quirales se preparan principalmente por medio de reducción química, y las aminas con actividad óptica se preparan usando cetonas proquirales. Catalizada mediante Pd/C y quinina, una cetona proquiral reacciona con ácido fórmico y un amoníaco o una amina primaria orgánica para generar una amina quiral. Otros investigadores obtuvieron una amina quiral a través de la aminación y reducción asimétricas de una cetona proquiral usando un complejo de rutenio como catalizador (Renat Kadyrov et al. Highly Enantioselective Hydrogen-Transfer Reductive Amination: Catalytic Asymmetric Synthesis of Primary Amines. *Angewandte Chemie International Edition*. 2003, 42 (44), página 5472 a página 5474). El catalizador metálico en tal reacción es un factor muy crítico, y demanda requisitos rigurosos sobre el catalizador metálico. También, es necesario llevar a cabo la reacción a temperatura elevada, y existen requisitos elevados sobre los dispositivos de operación. Adicionalmente, el catalizador metálico es caro, y un contaminante medioambiental (Ohkuma T et al. Trans-RuH (eta<sup>1</sup>-BH<sub>4</sub>) (binap) (1,2-diamine): a catalyst for asymmetric hydrogenation of simple ketones under base-free conditions. *Journal of the American Chemical Society*. 2002, 124(23), página 6508 a página 6509).

Una aminotransferasa, también conocida como una transaminasa, puede catalizar un proceso de intercambio entre grupos amino y carbonilo de alfa-aminoácidos. Una omega-transaminasa es una transaminasa que puede catalizar una reacción de transaminación usando sustratos distintos de alfa-aminoácido. La omega-transaminasa puede producir eficazmente una amina quiral a través de una transaminación estereoselectiva usando como materiales de partida una variedad de cetonas. La omega-transaminasa ha atraído cada vez más la atención de los investigadores, debido a su uso de sustancias relativamente baratas y su capacidad para producir productos muy puros.

Se espera que el potencial de omega-transaminasa se pueda aplicar totalmente a la producción industrial de aminas quirales. Sin embargo, todavía existe la necesidad de una investigación e invención adicionales de esta clase de enzima.

El documento WO2012/007548A1 describe un método para la síntesis enzimática de una (R)-amina enriquecida enantioméricamente, usando una cetona, un donante de amino, y una transaminasa. El documento WO2011/026556A1 se refiere a un procedimiento para la preparación de una amina quiral ópticamente activa, que comprende hacer reaccionar por lo menos un aceptor de amino y un donante de amino con una omega-transaminasa (R)-específica, y obtener la amina quiral ópticamente activa.

Existe una demanda de una omega-transaminasa con una actividad catalítica y estereoselectividad elevadas con respecto a la configuración R, de manera que se pueda satisfacer la demanda de amina quiral.

50 **Sumario de la invención**

El objetivo de la presente invención es proporcionar una nueva transaminasa y sus utilizaciones para satisfacer las demandas de la producción industrial de aminas quirales.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una transaminasa, o un compuesto modificado, o fragmento funcional de la misma, para lograr el fin anterior. La secuencia de aminoácidos de la transaminasa comprende una secuencia seleccionada de una de las siguientes secuencias: a) una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2 o 4; b) una secuencia de aminoácidos adquirida sustituyendo leucina en el sitio 38° de la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2 por isoleucina. El compuesto modificado de la transaminasa es un producto de acilación, alquilación, o PEGilación, que mantiene la actividad de la transaminasa con la actividad catalítica muy estereoselectiva con respecto a la configuración R, y el fragmento funcional se refiere a un fragmento proteínico que mantiene la actividad de la omega-transaminasa con la actividad catalítica muy estereoselectiva con respecto a la configuración R, en el que la secuencia de aminoácidos no es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia nucleotídica como se muestra en SEC ID N°: 5 o 6, y en el que la estereoselectividad elevada se refiere al contenido de uno de los estereoisómeros, que es por lo menos 1.1

veces el del otro.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un nucleótido. El nucleótido codifica la transaminasa o el compuesto modificado, o fragmento funcional del mismo, como se define anteriormente, y la secuencia nucleotídica no es la secuencia nucleotídica como se muestra en SEC ID N°: 5 (descrita en el documento WO2011/026556) o SEC ID N°: 6 (descrita en el documento WO 2012/007548).

Además, la secuencia del nucleótido comprende una secuencia seleccionada de entre una de las siguientes secuencias: una secuencia nucleotídica como se muestra en SEC ID N°: 1 o 3.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un vector recombinante. El nucleótido está conectado eficazmente en el vector recombinante.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula hospedadora. El vector recombinante anterior se transforma o transfecta en la célula hospedadora.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para sintetizar una amina quiral. El método incluye las siguientes etapas: obtener un compuesto cetónico, la transaminasa o el compuesto modificado, o fragmento funcional del mismo, fosfato de piridoxal, y un donante de amino para reaccionar en un sistema de reacción para obtener la amina quiral de configuración R.

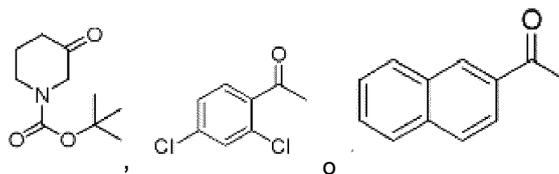
Además, el compuesto cetónico es



en el que  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  son independientemente alquilo de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_8$ , cicloalquilo de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$ , arilo de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$  o heteroarilo de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$ ; o  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  forman un radical heterocíclico de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$ , un radical carbocíclico de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$ , o un heteroarilo de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$  con un carbono en un grupo carbonilo; los heteroátomos en el radical heterocíclico de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$  y en el heteroarilo de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$  se seleccionan independientemente de entre por lo menos uno de nitrógeno, oxígeno y azufre; el arilo en el arilo de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$ , el heteroarilo en el heteroarilo de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$ , el radical carbocíclico en el radical carbocíclico de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$ , o el radical heterocíclico en el radical heterocíclico de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$ , está independientemente no sustituido o está sustituido con por lo menos un radical de halógeno, alcoxi o alquilo; preferentemente, el compuesto cetónico



se selecciona de entre



Además, el sistema de reacción incluye adicionalmente un promotor de la disolución, y el promotor de la disolución es dimetilsulfóxido o polietilenglicol, y el polietilenglicol es preferentemente PEG-400.

Además, el alquilo de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_8$  es alquilo lineal de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_8$ , el heteroarilo de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$  es un grupo de piridina, el alcoxi es alcoxi de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_6$ , el radical heterocíclico en el radical heterocíclico de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$  es piperidina, un sustituyente en el arilo en el arilo de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$ , en el heteroarilo en el heteroarilo de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$ , en el radical carbocíclico en el radical carbocíclico de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$ , o en el radical heterocíclico en el radical heterocíclico de  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_{10}$ , es independientemente alquilo lineal de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_6$  o alcoxi de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_6$ , y el donante de amino es isopropilamina o D-alanina.

Por medio de las soluciones técnicas de la presente invención, una omega-transaminasa de configuración R que presenta una elevada estereoselectividad, o un compuesto modificado, o un fragmento funcional del mismo, se puede usar para la síntesis muy eficiente de una amina quiral de configuración R con una pureza quiral relativamente elevada, y por lo tanto es adecuada para la producción industrial de aminas quirales.

**Breve descripción de los dibujos**

Los dibujos adjuntos de la memoria descriptiva, que forman parte de la solicitud, se usan para proporcionar una comprensión adicional de la presente invención. Las formas de realización ejemplificativas de la presente invención, y su ilustración, se usan para explicar la presente invención, en lugar de que constituyan una limitación inapropiada de la presente invención. En los dibujos adjuntos:

La figura 1 representa un diagrama de flujo de una reacción química de un uso de una transaminasa, derivada de *Aspergillus terreus* y *Hyphomonas neptunium*, en la síntesis de una amina quirál según una forma de realización de la presente invención;

la figura 2 es una ecuación de una reacción química de un uso de una transaminasa, derivada de *Aspergillus terreus* y *Hyphomonas neptunium*, en la síntesis de una amina quirál según una forma de realización de la presente invención;

la figura 3 representa un resultado de identificación de la digestión enzimática en la primera forma de realización de la presente invención;

la figura 4 representa un resultado de secuenciación de un gen mutante que se ha sometido a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la primera forma de realización de la presente invención;

la figura 5 representa un resultado de identificación de la digestión enzimática en la cuarta forma de realización de la presente invención; y

la figura 6 representa un resultado de secuenciación de un gen mutante que se ha sometido a una PCR en la cuarta forma de realización de la presente invención.

**Descripción detallada de las formas de realización**

Debe apreciarse que las formas de realización en la solicitud, y las características en las formas de realización, se pueden combinar entre sí si no existe ningún conflicto. La presente invención se expondrá en la presente memoria en adelante haciendo referencia a los dibujos adjuntos, y junto con las formas de realización.

Definición

El término “opcional/aleatorio” u “opcionalmente/aleatoriamente” significa que un suceso o una situación en la descripción posterior puede ocurrir o no. La descripción incluye que el suceso o la situación ocurra o no. Por ejemplo, “alquilo opcionalmente sustituido” se refiere a “alquilo no sustituido” (alquilo que no se ha sustituido con un sustituyente) o “alquilo sustituido” (alquilo que se ha sustituido con un sustituyente), como se define en la presente memoria en adelante.

El C1 a Cn, usado en la presente memoria, incluye C1 a C2, C1 a C3, .....C1 a Cn. Por ejemplo, el radical de “C1 a C4” significa que la parte presenta 1 a 4 átomos de carbono, esto es, el radical incluye 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, o 4 átomos de carbono.

El término “alquilo”, usado en la presente memoria separadamente o en combinación, se refiere a hidrocarburos alifáticos de cadena lineal opcionalmente sustituida o de cadena ramificada opcionalmente sustituida. El “alquilo”, en la presente memoria, puede tener preferentemente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, por ejemplo 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono, 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, 1 a aproximadamente 4 átomos de carbono, o 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono. El término “alcoxi”, usado en la presente memoria separadamente o en combinación, se refiere a un grupo éter de alquilo (O-alquilo). Las formas de realización no limitativas de alcoxi incluyen: metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, etcétera.

El término “halogenado” o “sustituido con halógeno”, usado en la presente memoria separadamente o en combinación, significa que uno o más átomos de hidrógeno en un radical opcionalmente sustituido (tal como alquilo, alquenilo y alquinilo) se sustituyen por átomos de flúor, cloro, bromo, yodo, o una combinación de los mismos.

La expresión “base aromática/arilo”, usada en la presente memoria separadamente o en combinación, se refiere a un hidrocarbilo aromático opcionalmente sustituido que presenta 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono en el ciclo, por ejemplo 6 a aproximadamente 12, o 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el ciclo, y puede ser un anillo aromático condensado o un anillo aromático no condensado.

El término “heteroarilo”, usado en la presente memoria separadamente o en combinación, se refiere a heteroarilo univalente opcionalmente sustituido que incluye 5 a aproximadamente 20, por ejemplo 5 a aproximadamente 12, o 5 a aproximadamente 10 átomos en el ciclo estructurales, en el que uno o más (por ejemplo 1 a 4, 1 a 3, o 1 a

2) átomos en el ciclo son heteroátomos, y los heteroátomos se seleccionan independientemente de heteroátomos en oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, silicio, selenio, y estaño, pero no se limitan de ese modo. Un anillo del radical no incluye dos átomos de O o S adyacentes. Heteroarilo incluye heteroarilo monocíclico o heteroarilo policíclico (tal como heteroarilo dicíclico, heteroarilo tricíclico, etcétera).

El término "heterociclo" o "radical heterocíclico", usado en la presente memoria separadamente o en combinación, se refiere a un heterociclo no aromático, incluyendo heterocicloalquilo, y heterocicloalqueno, en el que uno o más átomos en el ciclo (1 a 4, 1 a 3, o 1 a 2) son heteroátomos, tales como átomos de oxígeno, átomos de nitrógeno, o átomos de azufre. Un radical heterocíclico puede incluir un radical monoheterocíclico (un radical heterocíclico que presenta un anillo), o un radical poliheterocíclico (por ejemplo, un radical diheterocíclico (un radical heterocíclico que presenta dos anillos), un radical triheterocíclico, etcétera).

La expresión "radical carbocíclico", usada en la presente memoria separadamente o en combinación, se refiere a un anillo de carbonos no aromático, incluyendo cicloalquilo y cicloalqueno. El cicloalquilo puede ser cicloalquilo monocíclico o cicloalquilo policíclico (por ejemplo, que presenta 2, 3, o 4 anillos, tal como cicloalquilo dicíclico), y puede ser un anillo espiro o un anillo en puente. Un radical carbocíclico puede tener 3 a 20 átomos de carbono, tal como 3 a aproximadamente 15 átomos de carbono en el ciclo, 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el ciclo, o 3 a 6 átomos de carbono en el ciclo, y puede tener 0, 1, 2 o 3 dobles enlaces y/o 0, 1 o 2 triples enlaces, por ejemplo cicloalquilo que presenta 3 a 8 o 3 a 6 átomos de carbono en el ciclo.

"Halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo, y yodo, preferentemente flúor, cloro y bromo. Ciano se refiere a "-CN", hidroxilo se refiere a "-OH", mercapto se refiere a "-SH", y amino se refiere a "-NH<sub>2</sub>".

El término "sustituido" significa que uno o más grupos de hidrógeno en un átomo específico están sustituidos con un radical designado. Si la valencia normal del átomo designado está en, pero no más allá de, una condición existente, los resultados de la sustitución es un compuesto estable.

Como se menciona anteriormente, una omega-transaminasa en la técnica anterior todavía no satisface las demandas para la preparación de un compuesto de una amina quiral, y la presente invención proporciona una omega-transaminasa de configuración R, o un compuesto modificado, o fragmento funcional del mismo, a fin de mejorar la situación anterior. La secuencia de aminoácidos de la omega-transaminasa de configuración R incluye una secuencia seleccionada de las siguientes secuencias: a) una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2 o 4; b) una secuencia de aminoácidos adquirida sustituyendo leucina en el sitio 38° de la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2 por isoleucina,

en el que el compuesto modificado de la transaminasa es un producto de acilación, alquilación, o PEGilación, que mantiene la actividad de la transaminasa con la actividad catalítica muy estereoselectiva con respecto a la configuración R, y el fragmento funcional se refiere a un fragmento proteínico que mantiene la actividad de la transaminasa con la actividad catalítica muy estereoselectiva con respecto a la configuración R,

en el que la secuencia de aminoácidos no es la secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia nucleotídica como se muestra en SEC ID N°: 5 o 6; y

en el que la estereoselectividad elevada se refiere al contenido de uno de los estereoisómeros, que es por lo menos 1.1 veces el del otro.

La omega-transaminasa de configuración R de la presente invención se refiere a una omega-transaminasa que presenta una estereoselectividad por la configuración R elevada. En una forma de realización, la transaminasa de la presente invención se refiere a la transaminasa como se muestra en SEC ID N°: 2 o 4. La transaminasa es una nueva transaminasa obtenida sometiendo genes de transaminasa taAT y taHN, derivados de *Aspergillus terreus* y *Hyphomonas neptunium*, a mutación y modificación por medio de una técnica de biología molecular.

Según una forma de realización, que está fuera del alcance de la invención, la secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2 o 4, y que presenta la actividad de una omega-transaminasa con actividad catalítica muy estereoselectiva con respecto a la configuración R se refiere a una secuencia, que es por lo menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% o 99.7% idéntica, por ejemplo, a la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2, pero no es la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 5. Según una forma de realización que no está comprendida dentro del alcance de la invención, al mantener sin cambio los aminoácidos que desempeñan papeles claves en la actividad catalítica de la transaminasa entre la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2 o 4, los expertos en la materia pueden cambiar las secuencias de aminoácidos restantes de sitios inactivos, de manera que la secuencia de aminoácidos de una transaminasa obtenida presenta por lo menos más de 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2, y la transaminasa obtenida de esta manera presenta la misma actividad de transaminasa que la de una transaminasa que presenta la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2 o 4.

De forma similar, y según una forma de realización que no está comprendida dentro del alcance de la invención, uno o más aminoácidos se pueden sustituir, suprimir o añadir a los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2 o 4, mientras se mantengan los aminoácidos que desempeñan papeles claves en la actividad catalítica de la transaminasa entre la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2 o 4 sin cambiar; de este modo, una proteína derivada de SEC ID N°: 2 o 4 puede mantener la elevada estereoselectividad de la transaminasa como se muestra en SEC ID N°: 2 o 4, en el que puede haber una o más bases sustituidas, suprimidas o añadidas, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 o 50 aminoácidos, por ejemplo sustitución de aminoácidos conservados, en el que la secuencia de aminoácidos no es la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 5. "Sustitución de aminoácidos conservados" se refiere a combinaciones tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe y Tyr.

La estereoselectividad significa que cuando se generan en una reacción dos estereoisómeros A y B, el rendimiento de A es mayor que el de B, y la estereoselectividad elevada se refiere al contenido de uno de los estereoisómeros que es por lo menos aproximadamente 1.1 veces el del otro, por ejemplo por lo menos aproximadamente 1.2 veces, por lo menos aproximadamente 1.3 veces, por lo menos aproximadamente 1.4 veces, por lo menos aproximadamente 1.5 veces, por lo menos aproximadamente 2 veces, por lo menos aproximadamente 3 veces, por lo menos aproximadamente 4 veces, por lo menos aproximadamente 5 veces, por lo menos aproximadamente 10 veces, por lo menos aproximadamente 15 veces, por lo menos aproximadamente 20 veces, por lo menos aproximadamente 30 veces, por lo menos aproximadamente 40 veces, por lo menos aproximadamente 50 veces, por lo menos aproximadamente 70 veces, por lo menos aproximadamente 90 veces, por lo menos aproximadamente 100 veces, o mayor.

En la presente invención, el compuesto modificado de la omega-transaminasa de configuración R es un compuesto modificado químico, tal como un producto de acilación, alquilación, o polietilenglicosilación (PEGilación), en tanto que estos compuestos modificados mantengan la actividad de la omega-transaminasa con la actividad catalítica muy estereoselectiva con respecto a la configuración R. El fragmento funcional se refiere a un fragmento proteínico que mantiene la actividad de la omega-transaminasa con la actividad catalítica muy estereoselectiva con respecto a la configuración R.

En una forma de realización preferida de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de la transaminasa es una secuencia de aminoácidos adquirida sustituyendo leucina en el sitio 38° de la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2 por isoleucina. Tal sustitución entre aminoácidos que presentan propiedades similares permite que la transaminasa que presenta la secuencia de aminoácidos sustituida mantenga la actividad de la transaminasa que presenta la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2, y una elevada estereoselectividad.

La transaminasa obtenida mediante la presente invención, que es una omega-transaminasa con actividad catalítica muy estereoselectiva con respecto a la configuración R, se puede usar para la síntesis muy eficiente de una amina quiral de configuración R con una pureza quiral relativamente elevada, y por lo tanto es adecuada para la producción industrial de aminas quirales. La presente invención selecciona un objeto de ajuste y un sitio de ajuste de manera optimizada, de manera que una nueva transaminasa obtenida mediante transformación no afecta al plegamiento de las proteínas, a la vez que mantiene la actividad de transaminasa, que presenta actividad de transaminasa relativamente elevada y elevada estereoselectividad.

En otra forma de realización típica, se proporciona un nucleótido. El nucleótido codifica la omega-transaminasa de configuración R, o el compuesto modificado, o fragmento funcional del mismo, y una regla de codificación del nucleótido de la omega-transaminasa de configuración R, o del compuesto modificado, o del fragmento funcional del mismo, corresponde con una tabla de uso de codones convencional.

En una forma de realización más preferida de la presente invención, las secuencias del nucleótido incluyen una secuencia seleccionada de una de las siguientes secuencias: una secuencia nucleotídica como se muestra en SEC ID N°: 1 o 3.

La estereoselectividad significa que cuando se generan en una reacción dos estereoisómeros A y B, el rendimiento de A es mayor que el de B, y la estereoselectividad elevada se refiere al contenido de uno de los estereoisómeros que es por lo menos aproximadamente 1.1 veces el del otro, por ejemplo por lo menos aproximadamente 1.2 veces, por lo menos aproximadamente 1.3 veces, por lo menos aproximadamente 1.4 veces, por lo menos aproximadamente 1.5 veces, por lo menos aproximadamente 2 veces, por lo menos aproximadamente 3 veces, por lo menos aproximadamente 4 veces, por lo menos aproximadamente 5 veces, por lo menos aproximadamente 10 veces, por lo menos aproximadamente 15 veces, por lo menos aproximadamente 20 veces, por lo menos aproximadamente 30 veces, por lo menos aproximadamente 40 veces, por lo menos aproximadamente 50 veces, por lo menos aproximadamente 70 veces, por lo menos aproximadamente 90 veces, por lo menos aproximadamente 100 veces, o mayor.

Una condición muy restrictiva ejemplificativa puede ser que la hibridación se lleve a cabo a 65°C usando &X SSC y una disolución de SDS al 0.5%, y el lavado de la membrana se lleva a cabo mediante 2X SSC, SDS al 0.1% y

1X SSC, y SDS al 0.1%, cada vez, respectivamente.

El término "identidad", usado en la presente invención, presenta el significado generalmente conocido en la técnica. Los expertos en la materia también están familiarizados con las reglas y estándar para medir la identidad entre secuencias diferentes. Las secuencias limitadas por la presente invención con identidades de grados diferentes también necesitan tener al mismo tiempo la actividad de la omega-transaminasa con la actividad catalítica muy estereoselectiva con respecto a la configuración R.

Es conocido por aquellos expertos en la materia que un calificador usado para limitar las secuencias de aminoácidos o los polinucleótidos es "incluye", pero no significa que otras secuencias no relacionadas con las funciones de las secuencias de aminoácidos o los polinucleótidos se puedan añadir aleatoriamente a dos extremos de las secuencias de aminoácidos o los polinucleótidos. Es conocido por aquellos expertos en la materia que es necesario añadir sitios de restricción apropiados de endonucleasas de restricción, o codones iniciadores o codones de parada adicionales, etcétera, a ambos extremos de los polinucleótidos, para satisfacer los requisitos de una operación de recombinación. Por lo tanto, estas situaciones no se pueden cubrir verdaderamente si las secuencias están limitadas por una expresión cerrada.

Es generalmente conocidos por aquellos expertos en la materia que uno o más codones en las secuencias nucleotídicas se pueden sustituir equivalentemente sin cambiar los aminoácidos codificados. Por ejemplo, la leucina Leu codificada por CTT es sustituida por CTA, CTC o CTG, y el número de codones sustituidos puede ser uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 o 50, y en la técnica se conoce generalmente una tabla de uso de codones.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un vector recombinante. Cualquier nucleótido anterior está conectado eficazmente en el vector recombinante. El vector recombinante de la presente invención incluye, pero no se limita a, un vector de expresión recombinante, y también puede incluir un vector de clonación recombinante. El vector recombinante puede ser un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota. En una forma de realización de la presente invención, el vector recombinante es un vector de expresión procariota recombinante que puede inducir la expresión, por ejemplo un vector de la serie pET, que induce la expresión génica mediante IPTG, tal como un vector pET22b. En la presente invención, los vectores recombinantes que presentan la secuencia nucleotídica como se muestra en SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3 son pET22b-CM32 y pET22b-CM33, en el que "conectado eficazmente" se refiere a tal método de conexión que un polinucleótido se coloca en una localización apropiada del vector, de manera que el polinucleótido es copiado, transcrito y/o traducido correcta y perfectamente.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula hospedadora. Cualquier vector recombinante anterior se transforma o transfecta en la célula hospedadora. La célula hospedadora de la presente invención incluye una célula hospedadora procariota y una célula hospedadora eucariota. En una forma de realización de la presente invención, la célula hospedadora es una célula hospedadora procariota, tal como *Escherichia Coli*, preferentemente DH5 $\alpha$  (DE3).

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para sintetizar una amina quiral. El método incluye las siguientes etapas: obtener un compuesto cetónico, la omega-transaminasa de configuración R, o el compuesto modificado, o fragmento funcional del mismo, fosfato de piridoxal, y un donante de amino, para que reaccionen en un sistema de reacción para obtener la amina quiral. El método para sintetizar una amina quiral según la presente invención solamente necesita utilizar la transaminasa de la presente invención y hacer el ajuste apropiado de los parámetros, incluyendo los componentes, proporciones, cantidades de uso, valores de pH, temperatura y tiempo de reacción, etcétera, de los materiales de partida de la reacción del sistema de reacción, basado en un método convencional para preparar un compuesto quiral a través de una reacción catalizada mediante una enzima biológica en la técnica.

En una forma de realización preferida de la presente invención, el compuesto cetónico es

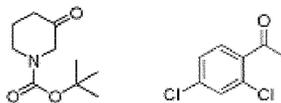


en el que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub>, cicloalquilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>, arilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub> o heteroarilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>; o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> forman un radical heterocíclico de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>, un radical carbocíclico de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>, o un heteroarilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub> con un carbono en un grupo carbonilo; los heteroátomos en el radical heterocíclico de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub> y en el heteroarilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub> se seleccionan independientemente de entre por lo menos uno de nitrógeno, oxígeno y azufre; el arilo en el arilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>, el heteroarilo en el heteroarilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>, el radical carbocíclico en el radical carbocíclico de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>, o el radical heterocíclico en el radical heterocíclico de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>, está independientemente no sustituido o está sustituido con por lo menos un radical de halógeno, alcoxi o alquilo; preferentemente, el compuesto cetónico

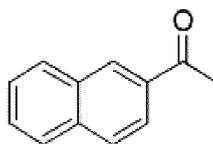


se selecciona de entre

5



o



10

El compuesto cetónico es una materia prima comercial o una materia prima que se puede preparar fácilmente, y es barato, y por lo tanto puede satisfacer las demandas de producción en masa.

15 En otra forma de realización preferida de la presente invención, el sistema de reacción incluye además un promotor de la disolución, y el promotor de la disolución es dimetilsulfóxido o polietilenglicol, y el polietilenglicol es preferentemente PEG-400. El promotor de la disolución puede disolver mejor las materias primas anteriores de manera que se puede llevar a cabo la reacción, y el PEG-400 presenta el mejor efecto promotor de la disolución.

20 En otra forma de realización preferida de la presente invención, el alquilo de C1 a C8 es alquilo lineal de C1 a C8, el heteroarilo de C5 a C10 es un grupo de piridina, el alcoxi es alcoxi de C1 a C6, el radical heterocíclico en el radical heterocíclico de C5 a C10 es piperidina, un sustituyente en el arilo en el arilo de C5 a C10, en el heteroarilo en el heteroarilo de C5 a C10, y en el radical carbocíclico en el radical carbocíclico de C5 a C10, o en el radical heterocíclico en el radical heterocíclico de C5 a C10, es independientemente alquilo lineal de C1 a C6 o alcoxi de C1 a C6, y el donante de amino es isopropilamina o D-alanina. Las materias primas anteriores son materias primas comerciales o materias primas que se pueden preparar fácilmente y son baratas, y por lo tanto pueden satisfacer las demandas de la producción a gran escala.

30 En una forma de realización preferida de la presente invención, el sistema de reacción contiene una disolución amortiguadora para mantener el valor del pH del sistema de reacción en un intervalo de 7.0 a 9.5, y/o en el que la relación de la cantidad de uso del compuesto cetónico a la del promotor de la disolución es 1 g/1 ml a 15 ml; y/o en el que la relación de la cantidad de uso del compuesto cetónico a la de la disolución amortiguadora es 1 g/15 ml a 50 ml, y/o en el que la relación de la cantidad de uso del compuesto cetónico a la del fosfato de piridoxal es 1 g/0.01 g a 0.1 g, y/o en el que la relación de la cantidad de uso del compuesto cetónico a la del donante de amino es 1 eq./1 eq. a 5 eq., y/o en el que la relación de la cantidad de uso del compuesto cetónico a la de la omega-transaminasa de configuración R es 1 g/0.2 g a 10 g; y/o en el que la temperatura del sistema de reacción es 20°C a 45°C y el tiempo de reacción es 12 h a 48 h, y/o en el que la disolución amortiguadora es una disolución amortiguadora de fosfato o una trietanolamina que presenta un valor de pH de pH = 9.3 a 9.5.

40 En otra forma de realización preferida de la presente invención, el método incluye además una etapa en la que el sistema de reacción se regula hasta pH  $\geq$  10 mediante un álcali, y una amina quiral producto en una fase acuosa se extrae mediante un disolvente orgánico. Preferentemente, el álcali es hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, y el disolvente orgánico es acetato de etilo, metil terc-butil éter, o 2-metiltetrahidrofurano.

45 En otra forma de realización típica de la presente invención, se proporciona una amina quiral de configuración R. La amina quiral de configuración R se sintetiza usando cualquier método anterior. La amina quiral de configuración R, preparada mediante la transaminasa de la presente invención, presenta una pureza quiral elevada, que puede ser tan elevada como más de 98%.

50 A continuación se describe el efecto beneficioso de la presente invención, en combinación con formas de realización específicas.

Los métodos son métodos convencionales, excepto que se especifique de otro modo en las siguientes formas de realización, y los materiales experimentales usados se pueden obtener fácilmente a partir de empresas comerciales, excepto que se especifique de otro modo.

55

Forma de realización 1: Preparación de la transaminasa AH-TACM33 derivada de *Aspergillus terreus* y *Hyphomonas neptunium*

Las etapas específicas de un método de preparación de una transaminasa AH-TACM33 de la presente invención son como se expone a continuación:

(1) Construcción del molde

Se encargó a Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd., llevar a cabo la síntesis génica completa de los genes de transaminasa taAT (*Aspergillus terreus*) (la secuencia nucleotídica es la secuencia génica como se muestra en SEC ID N°: 5 en el listado de secuencias, y la secuencia de aminoácidos es como se muestra en SEC ID N°: 23) y taHN (*Hyphomonas neptunium*) (la secuencia nucleotídica es la secuencia génica como se muestra en SEC ID N°: 6 en el listado de secuencias, y la secuencia de aminoácidos es como se muestra en SEC ID N°: 24) derivados de *Aspergillus terreus* y *Hyphomonas neptunium*. Los genes sintetizados taAT y taHN se conectan a un vector pUC57 para obtener respectivamente, los plásmidos recombinantes pUC57-taAT y pUC57-taHN, posteriormente los plásmidos recombinantes pUC57-taAT y pUC57-taHN se someten a digestión enzimática simultáneamente usando las endonucleasas de restricción Nde I y Xho I, y los fragmentos recuperados purificados taAT y taHN se obtienen a través de la recuperación en gel y se usan como moldes de PCR en la siguiente etapa.

2) Diseño de cebadores

Los cebadores específicos diseñados según el gen de transaminasa derivado de *Aspergillus terreus* son como se expone a continuación:

taAT A: 5'-CCGCTCGAGGTTACGCTCGTTGTAGTCAATTTTC-3' (SEC ID N°: 7)  
taAT S: 5'-GGAATTCATATGGCGTCTATGGACAAAG-3' (SEC ID N°: 8)

Los cebadores específicos diseñados según el gen de transaminasa derivado de *Hyphomonas neptunium* son como se expone a continuación:

taHN A: 5'-CCGCTCGAGCGGTGCATAGGTTACCGGTTTC-3' (SEC ID N°: 9)  
taHN S: 5'-GGAATTCATATGCTGACCTTCCAAAAAGTACTGAC-3' (SEC ID N°: 10)

Mientras tanto, se diseñaron 6 pares de cebadores según sitios diferentes, que son respectivamente como se expone a continuación:

CM31A: 5'-GAACTTCAGACCGCGGGTGACAATCAG-3' (SEC ID N°: 11)  
CM31S: 5'-CACCCGCGGTCTGAAGTTCCTGC-3' (SEC ID N°: 12)  
CM32A: 5'-CGGCGGAACACGACGAACGGTACG-3' (SEC ID N°: 13)  
CM32S: 5'-TTCGTCGTAATCCCGCCGGGCGCAC-3' (SEC ID N°: 14)  
CM33A: 5'-TAGCCTGCGCCCTCGGTCAGGTGAG-3' (SEC ID N°: 15)  
CM33S: 5'-GACCGAGGGCGCAGGCTACAATATC-3' (SEC ID N°: 16)  
CM34A: 5'-CCCTTCAGACCACGCGTAACGATGATC-3' (SEC ID N°: 17)  
CM34S: 5'-TTACGCGTGGTCTGAAGGGTGTGCGTG-3' (SEC ID N°: 18)  
CM35A: 5'-CCAGGCGGAGTACGACGTACAGTACGAG-3' (SEC ID N°: 19)  
CM35S: 5'-TACGTCGTGTTCCGCCTGGCGCAATC-3' (SEC ID N°: 20)  
CM36A: 5'-GCCGCTGCCTCCGTCGCGTTACC-3' (SEC ID N°: 21)  
CM36S: 5'-GACGGAAGGCAGCGGCTTCAACATC-3' (SEC ID N°: 22)

(3) Adquisición de una nueva transaminasa

El cebador específico taAT S (un cebador directo), diseñado en el gen de transaminasa derivado de *Aspergillus terreus*, se combina con cualquier cebador inverso en 3 cebadores inversos (CM31A, CM32A, CM33A) entre los 6 pares anteriores de cebadores, para amplificar un fragmento del gen de transaminasa derivado de *Aspergillus terreus*, o taHN A (un cebador inverso) se combina con uno cualquiera de 3 cebadores directos (CM36S, CM35S y CM34S) entre los 6 pares de cebadores, para amplificar un fragmento del gen de transaminasa derivado de *Hyphomonas neptunium*. A continuación, los dos fragmentos de orígenes diferentes, que se obtienen a partir de la amplificación, se integran para obtener un gen de transaminasa transformado.

De forma similar, el cebador específico taAT A (un cebador inverso), diseñado en el gen de transaminasa derivado de *Aspergillus terreus*, se combina con cualquier cebador directo en 3 cebadores directos (CM33S, CM32S, CM31S) entre los 6 pares de cebadores, para amplificar un fragmento del gen de transaminasa derivado de *Aspergillus terreus*, o taHN S (un cebador directo) se combina con uno cualquiera de 3 cebadores inversos (CM34A, CM35A y CM36A) entre los 6 pares de cebadores, para amplificar un fragmento del gen de transaminasa derivado de *Hyphomonas neptunium*. A continuación, los dos fragmentos de orígenes diferentes, que se obtienen a partir de la amplificación, se integran para obtener un gen de transaminasa transformado.

Las etapas de transformación específicas se explican tomando como ejemplos una transaminasa obtenida integrando el fragmento adquirido amplificando el cebador directo taAT S y el cebador inverso CM33A y el fragmento obtenido amplificando el cebador inverso taHN A y el cebador directo CM33S, y una transaminasa obtenida integrando el fragmento adquirido amplificando el promotor directo taAT S y el cebador inverso CM32A y el fragmento adquirido amplificando el cebador inverso taHN A y el cebador directo CM32S.

Las etapas para obtener la transaminasa AH-TACM33 son como se expone a continuación:

Etapa 1: Adquisición del fragmento A: el fragmento recuperado taAT se usa como molde de PCR, taAT S y CM33A se usan como cebadores para llevar a cabo la amplificación mediante PCR, y se recupera un producto mediante extracción y purificación en gel, para adquirir un fragmento A.

Etapa 2: Adquisición del fragmento B: el fragmento recuperado taHN se uso como molde de la PCR, taHN A y CM33S se usan como cebadores para llevar a cabo la amplificación mediante PCR, y se recupera un producto mediante extracción y purificación en gel, para adquirir un fragmento B.

Etapa 3: Adquisición del fragmento CM33: el fragmento A y el fragmento B adquiridos se usan como moldes y cebadores entre sí, la amplificación mediante PCR se lleva a cabo durante 5 ciclos, después los cebadores taAT S y taHN A se añaden directamente al sistema de PCR, se lleva a cabo la amplificación mediante PCR solapada, y se recupera un producto mediante extracción y purificación en gel, para adquirir un fragmento CM33.

Sistema de PCR: fragmento A 1 µl, fragmento B 1 µl, mezcla de PCR 5 µl, ddH<sub>2</sub>O 4.5.

Procedimiento de PCR: 95°C 3 min.; (95°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 90s, 5 ciclos); 72°C 1 min.

Se añaden al sistema respectivamente 0.2 µl del cebador taAT S y 0.2 µl del cebador taHN A.

Procedimiento de PCR: 95°C 3 min.; (95°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 90 s, 30 ciclos); 72°C 10 min.

Etapa 4: Adquisición del plásmido recombinante pET22b-CM33: los fragmentos CM33 y pET-22b (+) se someten simultáneamente a digestión enzimática usando Nde I y Xho I, la ligación se lleva a cabo usando T4 ADN ligasa, y un producto de ligación se transforma en una célula competente de una cepa DH5α de *Escherichia coli*, se resucita mediante un agitador, y después se reviste en una placa de cultivo de LB que contiene ampicilina que presenta una concentración final de 50 µg/ml, y se cultiva toda la noche en una incubadora a 37°C. Se selecciona una única colonia en la placa de cultivo, y se inocula en un medio de cultivo líquido LB que contiene ampicilina que presenta una concentración final de 50 µg/ml, y se somete a cultivo con agitación a 180 r/min. y 37°C, toda la noche. Se extrae un plásmido, se somete a PCR y se identifica mediante digestión enzimática, y un resultado de la identificación de la digestión enzimática es como se muestra en la figura 3.

La figura 3 representa un diagrama de identificación del plásmido pET22b-CM33 que se ha sometido a digestión doble de la enzima Nde I y la enzima Xho I, en la que 1 representa un vector vacío pET22b; 2 representa los marcadores de los tamaños de moléculas de ADN (10000 pb, 8000 pb, 6000 pb, 5000 pb, 4000 pb, 3500 pb, 3000 pb, 2500 pb, 2000 pb, 1500 pb, 1000 pb, 750 pb, 500 pb, 250 pb, respectivamente desde la parte superior a la parte inferior); y 3 representa pET22b-CM33-DH5α. A partir de la figura 3 se puede observar que una banda relativamente débil, que presenta un tamaño de fragmento de aproximadamente 1000 pb tras la digestión enzimática, es un fragmento diana (una banda de plásmido que no presenta el fragmento diana es relativamente fuerte), y de este modo se puede determinar que la dirección de inserción y el tamaño de una secuencia de inserción del plásmido recombinante pET22b-CM33 son correctos.

Etapa 5: Adquisición de BL21/pET22b-CM33: el plásmido recombinante obtenido pET22b-CM33 se transforma directamente en *Escherichia coli* BL21 (DE3), se resucita mediante un agitador, y después se reviste en una placa de cultivo de LB que contiene ampicilina que presenta una concentración final de 50 µg/ml, y se cultiva a 37°C toda la noche; se selecciona una única colonia en la placa de cultivo, y se inocula en 5 ml de un medio de cultivo líquido LB que contiene ampicilina que presenta una concentración final de 50 µg/ml, y se cultiva a 180 r/min. y a 37°C toda la noche; el líquido bacteriano se envía a Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd., para que sea secuenciado, y tras verificarlo correctamente a través de la secuenciación génica, el plásmido se nombra BL21/pET22b-CM33.

El resultado de la secuenciación se muestra en la figura 4, y se puede observar a partir de la figura 4 que la secuencia génica portada por el plásmido BL21/pET22b-CM33 en el resultado de secuenciación es completamente como se esperaba, y no hay ninguna base mutada. Tras identificarlo correctamente mediante la secuenciación, el plásmido recombinante es una secuencia plasmídica diana.

5 Etapa 6: Preparación de la transaminasa AH-TACM33: un líquido bacteriano del BL21/pET22b-CM33 se trasplanta en un medio de cultivo líquido LB que contiene ampicilina que presenta una concentración final de 50 µg/ml, se somete a cultivo con agitación a 180 r/min. y 37°C, y cuando el valor de OD600 es 0.6 a 0.8, se añade IPTG hasta que la concentración final es 0.2 mM, y la disolución de cultivo se transpone a 25°C para inducir la expresión; después de que la inducción se lleva a cabo durante 16 h, se extrae el líquido bacteriano y se centrifuga a 12000 r/min. durante 10 min., y se recogen talos; después de que las células se destruyen, los talos se centrifugan a 4°C y 12000 r/min. durante 20 min., para obtener un sobrenadante que es una transaminasa preparada AH-TACM33 que presenta una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 4 y una secuencia nucleotídica correspondiente como se muestra en SEC ID N°: 3.

#### Forma de realización 2: Experimento 1 de actividad de transaminasa AH-TACM33

15 A un matraz de reacción se le añaden 1 g de una materia prima principal (N-Boc-3-piperidona, CAS: 98977-36-7) y 1 ml de dimetilsulfóxido. Después de que las materias primas se dispersan, se añaden 50 ml de una disolución amortiguadora de trietanolamina que presenta una concentración de 0.2 moles/l y un valor de pH regulado a 9.3 a 9.5 mediante ácido clorhídrico concentrado en un baño de hielo, 0.765 g de isopropilamina, 0.01 g de fosfato de piridoxal, y 0.01 g de la transaminasa AH-TACM33, y se agitaron durante 12 h a una temperatura constante de 30°C, en el que el valor del pH del sistema es 9.5. El valor del pH del sistema se regula hasta por encima de 10 mediante NaOH 2N, la extracción se lleva a cabo dos veces mediante acetato de etilo, y la fase orgánica se seca, se filtra y se concentra para obtener un producto bruto (nombre en castellano: (R)-1-N-Boc-3-aminopiperidina, CAS: 188111-79-7). Mediante cromatografía de gases (GC) se detecta que la tasa de conversión es 90%, y el valor de e.e es 100%.

25 El dato de la resonancia magnética nuclear (RMN) del producto obtenido es como se expone a continuación: RMN 1H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.00-3.78 (m, 2H), 3.80 (m, 2H), 3.60 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.60-1.40 (m, 12H), 1.30 (m, 1H) ppm.

#### Forma de realización 3: Experimento 2 de actividad de la transaminasa AH-TACM33

30 En un matraz de reacción se añadieron 0.1 g de una materia prima principal (2,4-dicloroacetofenona, CAS: 2234-16-4) y 1.5 ml de polietilenglicol PEG-400. Después de que los materiales de partida se dispersan, se añaden 23.5 ml de una disolución amortiguadora de fosfato (pH 8.0), 0.031 g de isopropilamina, 0.0075 g de fosfato de piridoxal, y 0.02 g de la transaminasa AH-TACM33, y se agitaron durante 20 h a una temperatura constante de 45°C, en el que el valor del pH del sistema es 8.0. El valor del pH del sistema se regula hasta por encima de 10 mediante NaOH 2N, la extracción se lleva a cabo dos veces mediante acetato de etilo, y la fase orgánica se seca, se filtra y se concentra para obtener un producto bruto ((R)-(+)-1-(2,4-diclorofenil)etil]amina, CAS: 133773-29-2). Mediante GC se detecta que la tasa de conversión es 82%, y el valor de e.e es 100%.

40 El dato de RMN del producto obtenido es como se expone a continuación: RMN 1H (400MHz, DMSO D<sub>6</sub>): δ = 7.67 (d 1H), 7.60 (d, 1H), 7.47 (dd, 1H), 7.34 (dd, 4H), 7.23-7.12 (m, 6H), 4.84 (s, 1H), 4.47 (cuartete, 1H), 1.31 (d, 3H).

#### Forma de realización 4: Preparación de la transaminasa AH-TACM32 derivada de *Aspergillus terreus* y *Hyphomonas neptunium*

45 Las etapas específicas de un método de preparación de una transaminasa AH-TACM32 de la presente invención son como se expone a continuación:

##### (1) Construcción del molde

50 Los plásmidos recombinantes pUC57-taAT y pUC57-taHN se obtienen según el método de la forma de realización 1. Los plásmidos recombinantes pUC57-taAT y pUC57-taHN se someten simultáneamente a digestión enzimática usando las endonucleasas de restricción Nde I y Xho I, y los fragmentos recuperados purificados taAT y taHN se obtienen mediante recuperación en gel, y se usan como moldes de la PCR en la siguiente etapa.

##### (2) Diseño de cebadores

El diseño de cebadores es el mismo que en la forma de realización 1.

##### (3) Adquisición de una nueva transaminasa

65 Etapa 1: Adquisición del fragmento E: el fragmento recuperado taAT se usa como molde de PCR, taAT S y CM32A se usan como cebadores para llevar a cabo la amplificación mediante PCR, y se recupera un producto mediante extracción y purificación en gel, para adquirir un fragmento E.

Etapa 2: Adquisición del fragmento F: el fragmento recuperado taHN se uso como molde de la PCR, taHN A y

CM32S se usan como cebadores para llevar a cabo la amplificación mediante PCR, y se recupera un producto mediante extracción y purificación en gel, para adquirir un fragmento F.

5 Etapa 3: Adquisición del fragmento CM32: el fragmento E y el fragmento F adquiridos se usan como moldes y cebadores entre sí, la amplificación mediante PCR se lleva a cabo durante 5 ciclos, después los cebadores taAT S y taHN A se añaden directamente al sistema de PCR, se lleva a cabo la amplificación mediante PCR solapada, y se recupera un producto mediante extracción y purificación en gel, para adquirir un fragmento CM32.

10 Etapa 4: Adquisición del plásmido recombinante pET22b-CM32: los fragmentos CM32 y pET-22b (+) se someten simultáneamente a digestión enzimática usando Nde I y Xho I, la ligación se lleva a cabo usando T4 ADN ligasa, y un producto de ligación se transforma en una célula competente de una cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*, se resucita mediante un agitador, y después se reviste en una placa de cultivo de LB que contiene ampicilina que presenta una concentración final de 50  $\mu$ g/ml, y se cultiva toda la noche en una incubadora a 37°C. Se selecciona una única colonia en la placa de cultivo, y se inocula en un medio de cultivo líquido LB que contiene ampicilina que presenta una concentración final de 50  $\mu$ g/ml, y se somete a cultivo con agitación a 180 r/min. y 37°C, toda la noche. Se extrae un plásmido, se somete a PCR y se identifica mediante digestión enzimática, y un resultado de la identificación de la digestión enzimática es como se representa en la figura 5.

20 La figura 5 representa un diagrama de identificación del plásmido pET22b-CM32 que se ha sometido a digestión doble de la enzima Nde I y la enzima Xho I, en la que 1 representa los marcadores de los tamaños de moléculas de ADN (10000 pb, 8000 pb, 6000 pb, 5000 pb, 4000 pb, 3500 pb, 3000 pb, 2500 pb, 2000 pb, 1500 pb, 1000 pb, 750 pb, 500 pb, 250 pb, respectivamente desde la parte superior a la parte inferior); 2 representa pET22b-CM33-DH5 $\alpha$ ; y 3 representa un vector vacío pET22b.

30 A partir de la figura 5, se puede apreciar que una banda relativamente débil, que presenta un tamaño de fragmento de aproximadamente 1000 pb tras la digestión enzimática, es un fragmento diana (una banda de plásmido que no presenta el fragmento diana es relativamente fuerte), y de este modo se puede determinar que la dirección de inserción y el tamaño de una secuencia de inserción del plásmido recombinante pET22b-CM32 son correctos, para obtener el plásmido recombinante pET22b-CM32.

35 Etapa 5: Adquisición de BL21/pET22b-CM32: el plásmido recombinante obtenido pET22b-CM32 se transforma directamente en *Escherichia coli* BL21 (DE3), se resucita mediante un agitador, y después se reviste en una placa de cultivo de LB que contiene ampicilina que presenta una concentración final de 50  $\mu$ g/ml, y se cultiva a 37°C toda la noche; se selecciona una única colonia en la placa de cultivo, y se inocula en 5 ml de un medio de cultivo líquido LB que contiene ampicilina que presenta una concentración final de 50  $\mu$ g/ml, y se cultiva a 180 r/min. y a 37°C toda la noche; el líquido bacteriano se envía a Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd., para que sea secuenciado, y tras verificarlo correctamente a través de la secuenciación génica, el plásmido se nombra BL21/pET22b-CM32.

45 El resultado de la secuenciación se muestra en la figura 6, y se puede observar a partir de la figura 6 que la secuencia génica portada por el plásmido BL21/pET22b-CM32 en el resultado de secuenciación es completamente como se esperaba, y no existe ninguna base mutada. Tras identificarlo correctamente mediante la secuenciación, el plásmido recombinante es una secuencia plasmídica diana.

50 Etapa 6: Preparación de la transaminasa AH-TACM32: un líquido bacteriano del BL21/pET22b-CM32 se trasplanta en un medio de cultivo líquido LB que contiene ampicilina que presenta una concentración final de 50  $\mu$ g/ml, se somete a cultivo con agitación a 180 r/min. y 37°C, y cuando el valor de OD600 es 0.6 a 0.8, se añade IPTG hasta que la concentración final es 0.2 mM, y la disolución de cultivo se transpone a 25°C para inducir la expresión; después de que la inducción se lleva a cabo durante 16 h, se extrae el líquido bacteriano y se centrifuga a 12000 r/min. durante 10 min., y se recogen talos; después de que las células se destruyen, los talos se centrifugan a 4°C y 12000 r/min. durante 20 min., para obtener un sobrenadante que es una transaminasa preparada AH-TACM32 que presenta una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2 y la secuencia nucleotídica correspondiente como se muestra en SEC ID N°: 1.

#### Forma de realización 5: Experimento de actividad de la transaminasa AH-TACM32

60 En un matraz de reacción se añadieron 0.1 g de una materia prima principal (2-acetofenona, CAS: 93-08-3) y 1 ml de polietilenglicol PEG-400. Después de que los materiales de partida se dispersan, se añaden 24 ml de una disolución amortiguadora de fosfato (pH 7.0), 0.17 g de isopropilamina, 0.01 g de fosfato de piridoxal, y 0.004 g de la transaminasa AH-TACM32, y se agitaron durante 48 h a una temperatura constante de 20°C, en el que el valor del pH del sistema es 7.0. El valor del pH del sistema se regula hasta por encima de 10 mediante NaOH 2N, la extracción se lleva a cabo dos veces mediante acetato de etilo, y la fase orgánica se seca, se filtra y se concentra para obtener un producto bruto ((R)-(+)-1-(2-naftil)etilamina, CAS: 3906-16-9). Mediante GC, se detecta que la tasa

de conversión es 20%, y el valor de e.e es 100%.

El dato de RMN del producto obtenido es como se expone a continuación: RMN 1H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.86-7.76 (m, 4H), 7.52-7.41 (m, 3H), 4.29 (q, J=6.4Hz, 1H), 1.74 (br s, 2H), 1.48 (d, J=6.4Hz, 3H).

La presente invención verifica además la actividad de transaminasa de la transaminasa AH-TACM33 usando la materia prima principal (2-acetonaftona, CAS: 93-08-3), y verifica la actividad de transaminasa de la transaminasa AH-TACM32 usando una materia prima principal (N-Boc-3-piperidona, CAS: 98977-36-7) y una materia prima principal (2,4-dicloroacetofenona, CAS:2234-16-4); las etapas del método específicas son las mismas que las formas de realización anteriores.

#### Forma de realización 6

Sobre la base de la transaminasa que presenta una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 2, la leucina en el sitio 38° de la transaminasa se somete a mutagénesis dirigida al sitio para reemplazarla por isoleucina, para obtener una transaminasa que presenta una secuencia como se muestra en SEC ID N°: 25.

Se lleva a cabo un experimento de actividad enzimática para detectar la transaminasa, y las etapas de detección son como se expone a continuación:

se trasplanta un líquido bacteriano de mutantes a 100 ml de un medio de cultivo líquido LB que contiene ampicilina que presenta una concentración final de 50 µg/ml, se somete a cultivo con agitación a 180 r/min. y 37°C, y cuando el valor de OD<sub>600</sub> es 0.6 a 0.8, se añade IPTG hasta que la concentración final es 0.2 mM, y la disolución de cultivo se transpone a 25°C para inducir la expresión. Mientras tanto, como control negativo, se establece una disolución de cultivo libre del inductor IPTG. Después de que la inducción se lleva a cabo durante 16 h, el líquido bacteriano se recoge y se centrifuga a 12000 r/min. durante 5 min., y se recogen talos. Se pesan 0.5 g de lodo bacteriano y se resuspenden en 2.5 ml de una disolución amortiguadora de fosfato (pH 8.0), y las células de los talos se destruyen mediante un interruptor ultrasónico. Los parámetros ultrasónicos incluyen: diámetro de la sonda 6 mm, potencia 200 W, tiempo de funcionamiento 2 s, e intervalo 6 s, totalizando 10 min. Tras el procesamiento ultrasónico, se lleva a cabo la centrifugación a 12000 r/min. durante 20 min. a 4°C para obtener un sobrenadante y un precipitado ultrasónicos, y el sobrenadante se introduce en una reacción para verificar la actividad de transaminasa.

Se añaden 0.1 g de una materia prima principal (acetofenona, CAS: 98-86-2) a un matraz de reacción, la materia prima se dispersa en 13.5 ml de una disolución amortiguadora de fosfato que presenta una concentración de 0.1 M (pH 8.0), 0.356 g de D-alanina, 0.002 g de β-NAD<sup>+</sup>, 0.0192 g de deshidrogenasa láctica, 0.006 g de glucosa deshidrogenasa, 0.432 g de glucosa, 0.004 g de fosfato de piridoxal, y 2.5 de una omega-transaminasa de configuración R que presenta una secuencia codificada por SEC ID N°: 25, el valor del pH del sistema es 7.5, la agitación se lleva a cabo a una temperatura constante de 30°C durante 16 h, el valor del pH del sistema se regula hasta por encima de 10 mediante NaOH que presenta una concentración de 2N, la extracción se lleva a cabo dos veces mediante acetato de etilo, y la fase orgánica se seca, se filtra y se concentra para obtener un producto bruto (nombre en castellano: (R)-1-fenetilamina, CAS: 3886-69-9). Mediante GC, se detecta que la tasa de conversión es 83%, y el valor de e.e es 99.5%.

El dato de RMN del producto obtenido es como se expone a continuación: RMN 1H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, 300K) δ (ppm): 7.36-7.29 (m, 4H), 7.26-7.19 (m, 1H), 4.11 (q, J=6.6Hz, 1H), 1.53 (bs, 2H), 1.38 (d, J=6.6Hz, 3H).

El resultado muestra que la transaminasa en las formas de realización anteriores de la presente invención puede lograr rendimientos y pureza enantiomérica similares, obteniendo de ese modo aminas quirales correspondientes de configuración R.

Se puede apreciar a partir de la descripción anterior que las formas de realización de la presente invención han logrado el siguiente efecto técnico: una nueva transaminasa descrita por la presente invención cataliza la transferencia de un amino en un donante de amino a cetonas o aldehídos proquirales, generando de ese modo aminas quirales correspondientes de configuración R. Se puede obtener un producto diana, que presenta una pureza elevada, utilizando un método de síntesis de la nueva transaminasa de la presente invención, y la pureza óptica del producto obtenido se estabiliza por encima de 98%. El método de síntesis, que es simple, aplica materias primas fácilmente disponibles y presenta condiciones de reacción química suaves, un rendimiento elevado y elevada pureza enantiomérica, y operaciones simples en todo el procedimiento de producción, es un procedimiento de síntesis factible con poca contaminación, y proporciona un nuevo enfoque y un nuevo método para la preparación de aminas quirales.

Listado de secuencias

序列表

凯莱英医药集团（天津）股份有限公司；  
 凯莱英生命科学技术（天津）有限公司；  
 天津凯莱英制药有限公司；  
 凯莱英医药化学（阜新）技术有限公司  
 吉林凯莱英医药化学有限公司

5 <110>

<120> 转氨酶及其应用

<130> PN26394KLY

10

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.2

15

<210> SEC ID N°.1

<211> 975

<212> ADN

<213> 人工设计

20

<400> 1

```

atggcgtcta tggacaaagt ttttgcaggt tacgcggccc gtcaagcgat cctggaatct      60
actgagacta ccaaccctt  cgcgaaaggt atcgcgtggg tagaaggatga actggttccg      120
ctggcgggaag cacgcatccc gctgctggat cagggcttca tgcattccga cctgacgtat      180
gacgtgccgt ctgtgtggga tggccgcttc ttccgtctgg atgatcacat cactcgtctg      240
gaagcatcct gcactaaact gcgctctgcg ctgcctctgc cgcgtgatca ggtgaaacag      300
atcctgggtg aaatggttgc gaaatccggc attcgcgacg cgtttgtcga actgattgtc      360
accgcgggtc tgaaggggtg gcggtggcacc cgtccggaag acattgtaaa caacctgtac      420
atgttcgtgc agccgtacgt ctgggttatg gaaccggaca tgcagcgtgt tggcggcagc      480
gcagttgtag cccgtaccgt tcgtcgtact cgcgcgggcg cactggatcc gactatataa      540
aacctgcagt ggggcgatct ggttcgcggt ctgatggaag cagggcaccg tgattctttc      600
tttcctatc tgccgatgg cgacggtaac gcgacggaag ggcgaggcta caatatcgta      660
ctggtgcgta acggcgagct gcataccccg cgtcgtggcg ttctggaagg tattaccctg      720
cgtacgggtc tggagattgc agctgctcgc ggccctgaaaa ctacgctcac cgaaatccca      780
atccaggccc tgtatgaatg cgacgaactg tttatgtgca gcaccgctgg cggtatcatg      840
ccactggtgc tgctggatgg caacattgta ggtgacggca ccgttgggtcc ggtcacccgc      900
atgatttggg aagcgtactg ggacctgcac gacgaccgc agctgtctga accggaacc      960
tatgcaccgc tcgag      975
    
```

25

<210> SEC ID N°.2

<211> 325

<212> PRT

<213> 人工设计

<400> 2

Met Ala Ser Met Asp Lys Val Phe Ala Gly Tyr Ala Ala Arg Gln Ala  
 1 5 10 15

Ile Leu Glu Ser Thr Glu Thr Thr Asn Pro Phe Ala Lys Gly Ile Ala  
 20 25 30

Trp Val Glu Gly Glu Leu Val Pro Leu Ala Glu Ala Arg Ile Pro Leu  
 35 40 45

Leu Asp Gln Gly Phe Met His Ser Asp Leu Thr Tyr Asp Val Pro Ser  
 50 55 60

Val Trp Asp Gly Arg Phe Phe Arg Leu Asp Asp His Ile Thr Arg Leu  
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Cys Thr Lys Leu Arg Leu Arg Leu Pro Leu Pro Arg Asp  
 85 90 95

Gln Val Lys Gln Ile Leu Val Glu Met Val Ala Lys Ser Gly Ile Arg  
 100 105 110

Asp Ala Phe Val Glu Leu Ile Val Thr Arg Gly Leu Lys Gly Val Arg  
 115 120 125

Gly Thr Arg Pro Glu Asp Ile Val Asn Asn Leu Tyr Met Phe Val Gln  
 130 135 140

Pro Tyr Val Trp Val Met Glu Pro Asp Met Gln Arg Val Gly Gly Ser  
 145 150 155 160

Ala Val Val Ala Arg Thr Val Arg Arg Thr Pro Pro Gly Ala Leu Asp  
 165 170 175

Pro Thr Ile Lys Asn Leu Gln Trp Gly Asp Leu Val Arg Gly Leu Met  
 180 185 190

Glu Ala Gly Asp Arg Asp Ser Phe Phe Pro Ile Leu Pro Asp Gly Asp  
 195 200 205

5

ES 2 734 579 T3

Gly Asn Ala Thr Glu Gly Ala Gly Tyr Asn Ile Val Leu Val Arg Asn  
 210 215 220

Gly Glu Leu His Thr Pro Arg Arg Gly Val Leu Glu Gly Ile Thr Arg  
 225 230 235 240

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

Thr Glu Ile Pro Ile Gln Ala Leu Tyr Glu Cys Asp Glu Leu Phe Met  
 260 265 270

Cys Ser Thr Ala Gly Gly Ile Met Pro Leu Val Leu Leu Asp Gly Asn  
 275 280 285

Ile Val Gly Asp Gly Thr Val Gly Pro Val Thr Arg Met Ile Trp Glu  
 290 295 300

Ala Tyr Trp Asp Leu His Asp Asp Pro Gln Leu Ser Glu Pro Val Thr  
 305 310 315 320

Tyr Ala Pro Leu Glu  
 325

<210> SEC ID N°3

<211> 975

5 <212> ADN

<213> 人工设计

<400> 3

atggcgtcta tggacaaagt ttttgcaggt tacgcggccc gtcaagcgat cctggaatct 60

actgagacta ccaaccctt cgcgaaaggt atcgcgtggg tagaaggtga actggttccg 120

ctggcggaag cacgcatccc gctgctggat cagggcttca tgcattccga cctgacgtat 180

gacgtgccgt ctgtgtggga tggccgcttc ttccgtctgg atgatcacat cactcgtctg 240

gaagcatcct gcactaaact gcgtctgctc ctgcctctgc cgcgtgatca ggtgaaacag 300

atcctggttg aatggttgc gaaatccggc attcgcgacg cgtttgtcga actgattgtc 360

accgcggtc tgaaggggtg gcgtggcacc cgtccggaag acattgtaaa caacctgtac 420

atgttcgtgc agccgtacgt ctgggttatg gaaccggaca tgcagcgtgt tggcggcagc 480

gcagttgtag cccgtaccgt togtcgtgtt ccgcctggcg caatcgacct aactgttaaa 540

10 aatctgcagt ggggcgatct ggtacgcggt atgtttgaag ctgccgatcg tgggtgctact 600

ES 2 734 579 T3

tatccgttcc tgacggatgg tgacgctcac ctgaccgagg ggcgaggcta caataticgta 660  
 ctggtgacgta acggcgagct gcataccccg cgtcgtggcg ttctggaagg tattaccctg 720  
 cgtacgggtgc tggagattgc agctgctcgc ggctgaaaa ctcacgtcac cgaaatccca 780  
 atccaggccc tgtatgaatg cgacgaactg tttatgtgca gcaccgcggg cggtatcatg 840  
 ccactgggtgc tgctggatgg caacattgta ggtgacggca ccgttggtcc ggtcaccgcg 900  
 atgatttggg aagcgtactg ggacctgcac gacgaccgcg agctgtctga accggtaacc 960  
 tatgcaccgc tcgag 975

<210> SEC ID N°.4

<211> 325

5 <212> PRT

<213> 人工设计

<400> 4

Met Ala Ser Met Asp Lys Val Phe Ala Gly Tyr Ala Ala Arg Gln Ala  
 1 5 10 15

Ile Leu Glu Ser Thr Glu Thr Thr Asn Pro Phe Ala Lys Gly Ile Ala  
 20 25 30

Trp Val Glu Gly Glu Leu Val Pro Leu Ala Glu Ala Arg Ile Pro Leu  
 35 40 45

Leu Asp Gln Gly Phe Met His Ser Asp Leu Thr Tyr Asp Val Pro Ser  
 50 55 60

Val Trp Asp Gly Arg Phe Phe Arg Leu Asp Asp His Ile Thr Arg Leu  
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Cys Thr Lys Leu Arg Leu Arg Leu Pro Leu Pro Arg Asp  
 85 90 95

Gln Val Lys Gln Ile Leu Val Glu Met Val Ala Lys Ser Gly Ile Arg  
 100 105 110

Asp Ala Phe Val Glu Leu Ile Val Thr Arg Gly Leu Lys Gly Val Arg  
 115 120 125

10 Gly Thr Arg Pro Glu Asp Ile Val Asn Asn Leu Tyr Met Phe Val Gln  
 130 135 140

ES 2 734 579 T3

Pro Tyr Val Trp Val Met Glu Pro Asp Met Gln Arg Val Gly Gly Ser  
145 150 155 160

Ala Val Val Ala Arg Thr Val Arg Arg Val Pro Pro Gly Ala Ile Asp  
165 170 175

Pro Thr Val Lys Asn Leu Gln Trp Gly Asp Leu Val Arg Gly Met Phe  
180 185 190

Glu Ala Ala Asp Arg Gly Ala Thr Tyr Pro Phe Leu Thr Asp Gly Asp  
195 200 205

Ala His Leu Thr Glu Gly Ala Gly Tyr Asn Ile Val Leu Val Arg Asn  
210 215 220

Gly Glu Leu His Thr Pro Arg Arg Gly Val Leu Glu Gly Ile Thr Arg  
225 230 235 240

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

Thr Glu Ile Pro Ile Gln Ala Leu Tyr Glu Cys Asp Glu Leu Phe Met  
260 265 270

Cys Ser Thr Ala Gly Gly Ile Met Pro Leu Val Leu Leu Asp Gly Asn  
275 280 285

Ile Val Gly Asp Gly Thr Val Gly Pro Val Thr Arg Met Ile Trp Glu  
290 295 300

Ala Tyr Trp Asp Leu His Asp Asp Pro Gln Leu Ser Glu Pro Val Thr  
305 310 315 320

Tyr Ala Pro Leu Glu  
325

<210> SEC ID N°5

<211> 981

5 <212> ADN

<213> 土曲霉菌

<400> 5

atggcaagca tggataaagt ttttgcaggt tatgcagcac gtcaggcaat tctggaaagc 60

10 accgaaacca ccaatccgtt tgcaaaaggt attgcatggg ttgaaggatga actggttccg 120

ES 2 734 579 T3

ctggcagaag cacgtattcc gctgctggat cagggtttta tgcatagcga tctgacctat 180  
gatgttccga gcgtttgga tggctgttt tttcgtctgg atgatcatat taccctctg 240  
gaagcaagct gtaccaaact gcgtctgcgt ctgccgctgc ctcgtgatca ggtaaacia 300  
attctggttg aatgggtgc caaaagcgg attcgtgatg catttggtga actgattggt 360  
accctgggtc tgaaggtgt tcgtggcacc cgtccggaag atattgtaa taatctgtat 420  
atgtttgtgc agccgtatgt ttgggttatg gaaccggata tgcagcgtgt tgggtgtagc 480  
gcagttgttg cacgtaccgt tcgtcgtgtt cgcgcgggtg caattgatcc gaccgttaa 540  
aatctgcagt ggggtgatct ggttcgtggt atgtttgaag cagcagatcg tgggtcaacc 600  
tatccgtttc tgaccgatgg tgatgcacat ctgaccgaag gtagcggctt taacattggt 660  
ctggtaaag atggcgtgct gtatacaccg gatcgtgggt ttctgcaggg tgttaccctg 720  
aaaagcgtta ttaatgcagc agaagccttt ggtattgaag ttcgtggtga atttgttccg 780  
gttgaactgg catatcgtcg tgatgaaatc tttatgtgta ccaccgcagg cggattatg 840  
ccgattacca ccctggatgg tatgccggtt aatgggtggtc agattggtcc gattacaaa 900  
aaaatctggg atggttattg ggccatgcat tatgatgcag catatagctt tgaattgat 960  
tataatgaac gcaatctcga g 981

<210> SEC ID N°.6

<211> 969

5 <212> ADN

<213> 海王生丝单胞菌

<400> 6

atgctgacct ttcagaaagt tctgaccggt tttcagacc gtgcagatgc acgtgcagaa 60  
cgtaccgatg ctttgcaga tggattgca tggattgaaa atgaattgt gccgattggc 120  
aaagcacgta ttccgattct ggatcagggt tttctgcata gcgatctgac ctatgatggt 180  
ccggcagttt ggaatggctg tttttctg ctggatgatc atctggatcg tctggaagtt 240  
agctgtgcaa aatgcgtct gccgctgccg attgcacgtc cggactgctg tcgtctggtt 300  
atggaactgg ttagccgtag cggctctgct gatgcctatg ttgaaattat tgttaccctg 360  
ggcctgaaat ttctgcgtgg tgcacaggca gaagatatta ttccgaatct gtatctgatg 420  
gccgttccgt atgtttggat tctgccgctg gaatatcaga atcatggtgc accggcagtt 480  
gttaccctgta ccgttcgtcg tacaccgccg ggtgactg atccgacct caaaaatctg 540  
10 cagtgggtg atctggttcg tggctctgatg gaagccggtg atcgtgatag cttttttccg 600

ES 2 734 579 T3

attctgccgg atggtgatgg taatgcaacc gaaggtgcag gctataacat tgttctggtt 660  
 cgtaatggcg aactgcatac accgcgtcgt ggtgttctgg aaggattac ccgtcgtacc 720  
 gttctggaaa ttgcagcagc acgtggcctg aaaacacatg ttaccgaaat tccgattcag 780  
 gcactgtatg aatgtgatga actgtttatg tgtagcaccg caggcggat tatgccgctg 840  
 gttctgctgg atggtaatat tgttggtgat ggcaccgttg gtccggttac ccgtatgatt 900  
 tgggaagcat attgggatct gcatgatgat ccgcagctga gcgaaccggt tacctatgca 960  
 ccgctcgag 969

<210> SEC ID N°.7  
 <211> 33  
 5 <212> ADN  
 <213> 人工合成

<400> 7

10 ccgctcgagg ttacgctcgt tgtagtcaat ttc33

<210> SEC ID N°.8  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 15 <213> 人工合成

<400> 8

20 ggaattccat atggcgtcta tggacaaag 29

<210> SEC ID N°.9  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 25 <213> 人工合成

<400> 9

30 ccgctcgagc ggtgcatagg ttaccggtc 30

<210> SEC ID N°.10  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 35 <213> 人工合成

<400> 10

40 ggaattccat atgctgacct tccaaaaagt actgac 36

<210> SEC ID N°.11  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 45 <213> 人工合成

<400> 11

50 gaacttcaga ccgcgggtga caatcag 27

<210> SEC ID N°.12  
 <211> 23  
 <212> ADN

<213> 人工合成

<400> 12

5 caccgcggt ctgaagtcc tgc 23

<210> SEC ID N°.13  
 <211> 24  
 <212> ADN

10 <213> 人工合成

<400> 13

15 cggcgggaaca cgacgaacgg tacg 24

<210> SEC ID N°.14  
 <211> 24  
 <212> ADN

20 <213> 人工合成

<400> 14

ttcgtcgtac tccgccgggc gcac 24

25 <210> SEC ID N°.15  
 <211> 25  
 <212> ADN

<213> 人工合成

30 <400> 15

tagcctgcgc cctcggtcag gtgag 25

35 <210> SEC ID N°.16  
 <211> 25  
 <212> ADN

<213> 人工合成

<400> 16

40 gaccgagggc gcaggctaca atatc 25

<210> SEC ID N°.17  
 <211> 27  
 <212> ADN

45 <213> 人工合成

<400> 17

50 cccttcagac caccgtaac gatgatc 27

<210> SEC ID N°.18  
 <211> 27  
 <212> ADN

55 <213> 人工合成

<400> 18

ttacgcgtgg tctgaagggt gtgcgtg 27

60 <210> SEC ID N°.19

ES 2 734 579 T3

<211> 28  
<212> ADN  
<213> 人工合成

5 <400> 19

ccaggcggag tacgacgtac agtacgag 28

<210> SEC ID N°.20  
10 <211> 26  
<212> ADN  
<213> 人工合成

15 <400> 20

tacgtcgtgt tccgcctggc gcaatc 26

<210> SEC ID N°.21  
20 <211> 24  
<212> ADN  
<213> 人工合成

<400> 21

25 gccgctgcct tccgtcgcgt tacc 24

<210> SEC ID N°.22  
30 <211> 25  
<212> ADN  
<213> 人工合成

<400> 22

35 gacggaaggc agcggcttca acatc 25

<210> SEC ID N°.23  
<211> 327  
<212> PRT  
<213> 人工设计

40 <400> 23

Met Ala Ser Met Asp Lys Val Phe Ala Gly Tyr Ala Ala Arg Gln Ala  
1 5 10 15

Ile Leu Glu Ser Thr Glu Thr Thr Asn Pro Phe Ala Lys Gly Ile Ala



ES 2 734 579 T3

Glu Phe Val Pro Val Glu Leu Ala Tyr Arg Cys Asp Glu Ile Phe Met  
260 265 270

Cys Thr Thr Ala Gly Gly Ile Met Pro Ile Thr Thr Leu Asp Gly Met  
275 280 285

Pro Val Asn Gly Gly Gln Ile Gly Pro Ile Thr Lys Lys Ile Trp Asp  
290 295 300

Gly Tyr Trp Ala Met His Tyr Asp Ala Ala Tyr Ser Phe Glu Ile Asp  
305 310 315 320

Tyr Asn Glu Arg Asn Leu Glu  
325

<210> SEC ID N°24

<211> 323

5 <212> PRT

<213> 人工设计

<400> 24

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

Ala Arg Ala Glu Arg Thr Asp Ala Phe Ala Asp Gly Ile Ala Trp Ile  
20 25 30

Glu Asn Glu Phe Val Pro Ile Gly Lys Ala Arg Ile Pro Ile Leu Asp  
35 40 45

Gln Gly Phe Leu His Ser Asp Leu Thr Tyr Asp Val Pro Ala Val Trp  
50 55 60

Asn Gly Arg Ile Phe Arg Leu Asp Asp His Leu Asp Arg Leu Glu Val  
65 70 75 80

Ser Cys Ala Lys Met Arg Leu Pro Leu Pro Ile Ala Arg Pro Glu Leu  
85 90 95

Arg Arg Leu Val Met Glu Leu Val Ser Arg Ser Gly Leu Arg Asp Ala  
100 105 110

10 Tyr Val Glu Ile Ile Val Thr Arg Gly Leu Lys Phe Leu Arg Gly Ala  
115 120 125

ES 2 734 579 T3

Gln Ala Glu Asp Ile Ile Pro Asn Leu Tyr Leu Met Ala Val Pro Tyr  
 130 135 140

Val Trp Ile Leu Pro Leu Glu Tyr Gln Asn His Gly Ala Pro Ala Val  
 145 150 155 160

Val Thr Arg Thr Val Arg Arg Thr Pro Pro Gly Ala Leu Asp Pro Thr  
 165 170 175

Ile Lys Asn Leu Gln Trp Gly Asp Leu Val Arg Gly Leu Met Glu Ala  
 180 185 190

Gly Asp Arg Asp Ser Phe Phe Pro Ile Leu Pro Asp Gly Asp Gly Asn  
 195 200 205

Ala Thr Glu Gly Ala Gly Tyr Asn Ile Val Leu Val Arg Asn Gly Glu  
 210 215 220

Leu His Thr Pro Arg Arg Gly Val Leu Glu Gly Ile Thr Arg Arg Thr  
 225 230 235 240

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

Ile Pro Ile Gln Ala Leu Tyr Glu Cys Asp Glu Leu Phe Met Cys Ser  
 260 265 270

Thr Ala Gly Gly Ile Met Pro Leu Val Leu Leu Asp Gly Asn Ile Val  
 275 280 285

Gly Asp Gly Thr Val Gly Pro Val Thr Arg Met Ile Trp Glu Ala Tyr  
 290 295 300

Trp Asp Leu His Asp Asp Pro Gln Leu Ser Glu Pro Val Thr Tyr Ala  
 305 310 315 320

Pro Leu Glu

<210> SEC ID N°.25

<211> 325

<212> PRT

<213> 人工设计

5

ES 2 734 579 T3

<400> 25

Met Ala Ser Met Asp Lys Val Phe Ala Gly Tyr Ala Ala Arg Gln Ala  
1 5 10 15

Ile Leu Glu Ser Thr Glu Thr Thr Asn Pro Phe Ala Lys Gly Ile Ala  
20 25 30

Trp Val Glu Gly Glu Ile Val Pro Leu Ala Glu Ala Arg Ile Pro Leu  
35 40 45

Leu Asp Gln Gly Phe Met His Ser Asp Leu Thr Tyr Asp Val Pro Ser  
50 55 60

Val Trp Asp Gly Arg Phe Phe Arg Leu Asp Asp His Ile Thr Arg Leu  
65 70 75 80

Glu Ala Ser Cys Thr Lys Leu Arg Leu Arg Leu Pro Leu Pro Arg Asp  
85 90 95

Gln Val Lys Gln Ile Leu Val Glu Met Val Ala Lys Ser Gly Ile Arg  
100 105 110

Asp Ala Phe Val Glu Leu Ile Val Thr Arg Gly Leu Lys Gly Val Arg  
115 120 125

Gly Thr Arg Pro Glu Asp Ile Val Asn Asn Leu Tyr Met Phe Val Gln  
130 135 140

Pro Tyr Val Trp Val Met Glu Pro Asp Met Gln Arg Val Gly Gly Ser  
145 150 155 160

Ala Val Val Ala Arg Thr Val Arg Arg Thr Pro Pro Gly Ala Leu Asp  
165 170 175

Pro Thr Ile Lys Asn Leu Gln Trp Gly Asp Leu Val Arg Gly Leu Met  
180 185 190

Glu Ala Gly Asp Arg Asp Ser Phe Phe Pro Ile Leu Pro Asp Gly Asp  
195 200 205

Gly Asn Ala Thr Glu Gly Ala Gly Tyr Asn Ile Val Leu Val Arg Asn  
210 215 220

ES 2 734 579 T3

Gly Glu Leu His Thr Pro Arg Arg Gly Val Leu Glu Gly Ile Thr Arg  
225 230 235 240

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

Thr Glu Ile Pro Ile Gln Ala Leu Tyr Glu Cys Asp Glu Leu Phe Met  
260 265 270

Cys Ser Thr Ala Gly Gly Ile Met Pro Leu Val Leu Leu Asp Gly Asn  
275 280 285

Ile Val Gly Asp Gly Thr Val Gly Pro Val Thr Arg Met Ile Trp Glu  
290 295 300

Ala Tyr Trp Asp Leu His Asp Asp Pro Gln Leu Ser Glu Pro Val Thr  
305 310 315 320

Tyr Ala Pro Leu Glu  
325

## REIVINDICACIONES

1. Transaminasa o compuesto modificado, o fragmento funcional de la misma, en la/el que una secuencia de aminoácidos de la transaminasa comprende una secuencia seleccionada de entre una de las secuencias siguientes:

a) una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID nº: 2 o 4;

b) una secuencia de aminoácidos adquirida sustituyendo leucina en el sitio 38º de la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID nº: 2 por isoleucina,

en la/el que el compuesto modificado de la transaminasa es un producto de acilación, alquilación, o PEGilación, que mantiene la actividad de la transaminasa con la actividad catalítica altamente estereoselectiva de configuración R, y el fragmento funcional se refiere a un fragmento proteínico que mantiene la actividad de la transaminasa con la actividad catalítica altamente estereoselectiva de configuración R,

en la/el que altamente estereoselectiva se refiere al contenido de uno de los estereoisómeros que es por lo menos 1.1 veces el del otro.

2. Nucleótido, en el que el nucleótido codifica la transaminasa o el compuesto modificado, o fragmento funcional de la misma según la reivindicación 1.

3. Nucleótido según la reivindicación 2, en el que una secuencia del nucleótido incluye una secuencia seleccionada de entre una de las secuencias siguientes:

una secuencia de nucleótido como se muestra en SEC ID nº: 1 o 3.

4. Vector recombinante, en el que el nucleótido según la reivindicación 2 o 3 está conectado eficazmente en el vector recombinante.

5. Célula hospedadora, en la que el vector recombinante según la reivindicación 4 se transforma o transfecta en la célula hospedadora.

6. Método para sintetizar una amina quiral, en el que el método comprende las etapas siguientes: hacer que un compuesto cetónico, la transaminasa o el compuesto modificado, o fragmento funcional de la misma según la reivindicación 1, fosfato de piridoxal, y un donante de amino reaccionen en un sistema de reacción para obtener la amina quiral de configuración R.

7. Método según la reivindicación 6, en el que el compuesto cetónico es

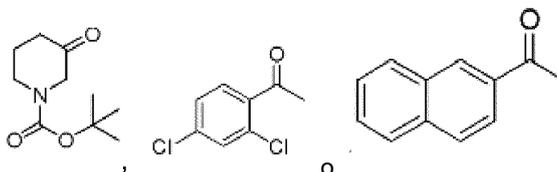


en el que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub>, base nafténica de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>, arilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub> o heteroarilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>; o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> forman un radical heterocíclico de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>, un radical carbocíclico de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub> o heteroarilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub> con un carbono en un grupo carbonilo; los heteroátomos en el radical heterocíclico de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub> y el heteroarilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub> se seleccionan independientemente de entre por lo menos uno de nitrógeno, oxígeno y azufre; el arilo en el arilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>, el heteroarilo en el heteroarilo de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>, el radical carbocíclico en el radical carbocíclico de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub> o el radical heterocíclico en el radical heterocíclico de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub> está independientemente no sustituido o está sustituido con por lo menos un radical de halógeno, alcoxi o alquilo.

8. Método según la reivindicación 7, en el que el compuesto cetónico



se selecciona de entre



9. Método según la reivindicación 7 u 8, en el que el sistema de reacción incluye además un promotor de disolución, y el promotor de disolución es el dimetilsulfóxido o el polietilenglicol.

5 10. Método según la reivindicación 9, en el que el polietilenglicol es PEG-400.

10 11. Método según la reivindicación 7, en el que el alquilo de C1 a C8 es alquilo lineal de C1 a C8, el heteroarilo de C5 a C10 es un grupo de piridina, el alcoxi es alcoxi de C1 a C6, el radical heterocíclico en el radical heterocíclico de C5 a C10 es piperidina, un sustituyente en el arilo en el arilo de C5 a C10, el heteroarilo en el heteroarilo de C5 a C10, el radical carbocíclico en el radical carbocíclico de C5 a C10 o el radical heterocíclico en el radical heterocíclico de C5 a C10 es independientemente alquilo lineal de C1 a C6 o alcoxi de C1 a C6 y el donante de amino es isopropilamina o D-alanina.

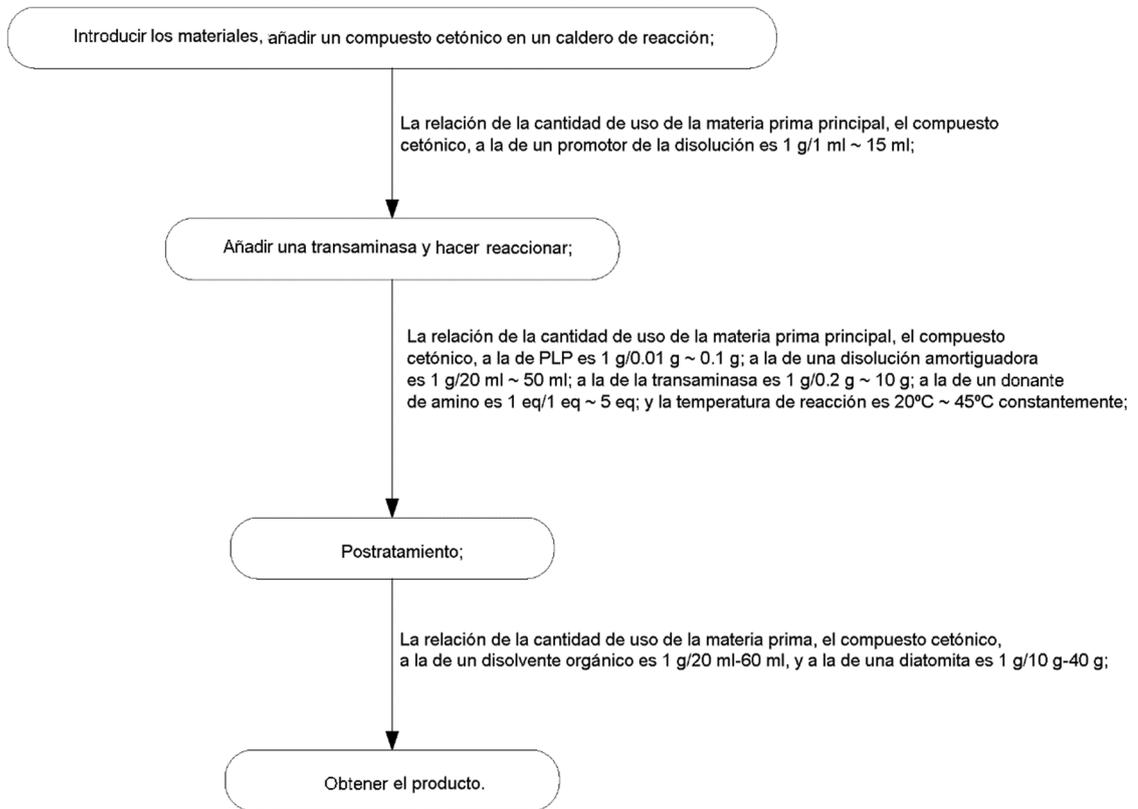


Fig. 1

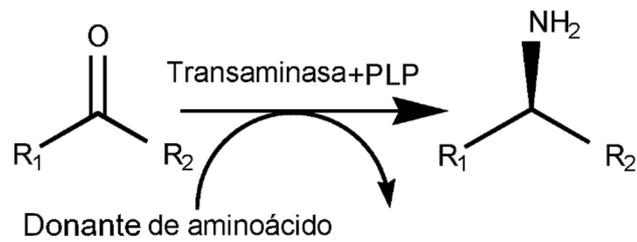


Fig. 2

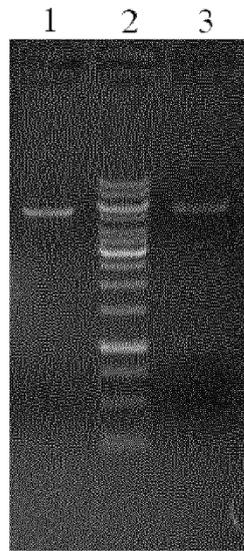


Fig. 3

taAT.sec	MASMDKVFACYAARQALLESSTETINPEAKGIAWVEGETIVPLABARIEILLDQGFHMSDLITY	60
AH-TACM33.sec	MASMDKVFACYAARQALLESSTETINPEAKGIAWVEGETIVPLABARIEILLDQGFHMSDLITY	60
taHN.sec	MLTFQKVLITCFQTRAL..ARAERTLDAFADGIAWIENEFVPIGKARIEILLDQGHHSDLITY	58
Consenso	m kv g r e t fa giaw e e vp arip ldggf hsdltiy	
taAT.sec	DVESVWDCRFFRLLDDHTIRLEASCTKLRRLRIELPRDQVKQIILVEMVAKSGIRDAFVELIV	120
AH-TACM33.sec	DVESVWDCRFFRLLDDHTIRLEASCTKLRRLRIELPRDQVKQIILVEMVAKSGIRDAFVELIV	120
taHN.sec	DVEAVWNGRIERLDDHLDRLEVSCAKVRLPLEIARPELRRIVMEIVSRSGLRDAYVEIV	118
Consenso	dvp vw gr frlldh rle sc k rl lp r e v sg rda ve iv	
taAT.sec	TRGLKGVRCIREFEDIVNLYMFVQPYVWVMEEDMQRVGGSAVVARTVRFVPPGALDPIVK	180
AH-TACM33.sec	TRGLKGVRCIREFEDIVNLYMFVQPYVWVMEEDMQRVGGSAVVARTVRFVPPGALDPIVK	180
taHN.sec	TRGLKFLRGAQAEELIIEENLYLMAVYVWIIIPLEYQNEGAPAVVTRTVRFTPPGALDPIIK	178
Consenso	trglk rg edi nly pyvw q g avv rtvrr ppga dpt k	
taAT.sec	NLQWCDLVRGMFEAADRGATYEFLLTDCDAHLTEGSGFNIVIVKDCVLYTPDRGVLCGVTR	240
AH-TACM33.sec	NLQWCDLVRGMFEAADRGATYEFLLTDCDAHLTEGAGYNIVIVRNGELETPRRGVLEGITR	240
taHN.sec	NLQWCDLVRGLMEAGDRDSFFEILLDCDGNATEGAGYNIVIVRNGELETPRRGVLEGITR	238
Consenso	nlqwgdivrg ea dr p l dgd teg g nivlv g l tp rgvl g tr	
taAT.sec	KSVINAAAFAGIEVRVEFVPELAYRCDEIFMOTTAGGIMPITITLDGMFVNGCQIGPITK	300
AH-TACM33.sec	RTVLEIAAARGLKTHVTEIPIQALYECDELFCSTAGCIMBLVLLDGNIVGDCITVGFVIR	300
taHN.sec	RTVLEIAAARGLKTHVTEIPIQALYECDELFCSTAGCIMBLVLLDGNIVGDCITVGFVIR	298
Consenso	v a a g v p y cde frc taggimp ldg v g gp t	
taAT.sec	KIWDGYWAMFYDAAYSFEIDNERNL	326
AH-TACM33.sec	MIWEAYWLLHDDFQLSEFVTYAF..L	324
taHN.sec	MIWEAYWLLHDDFQLSEFVTYAF..L	322
Consenso	iw yw h d s y l	

Fig. 4

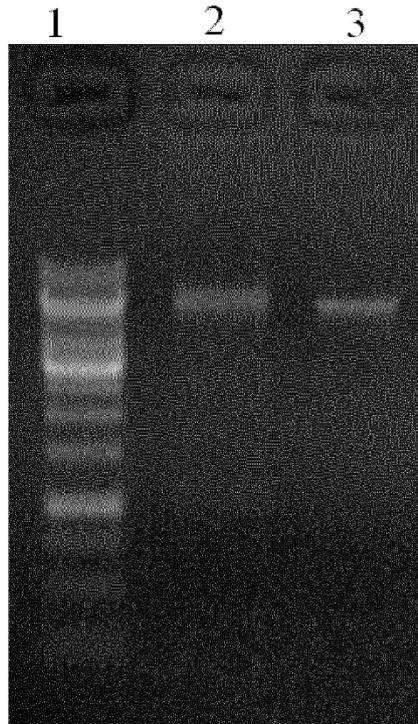


Fig. 5

taAT.sec	MASMDVVFACVAAEQAILLESTDTTNEFAKCIAWVEGGLVPLABARIELIDQGFHSDITY	60
AH-TACM32.sec	MASMDVVFACVAAEQAILLESTDTTNEFAKCIAWVEGGLVPLABARIELIDQGFHSDITY	60
taHN.sec	MLTFQVLLGCFQTRAD..ARRAERTDEFAKCIAWVEGGLVPLABARIELIDQGFHSDITY	58
Consenso	m kv g r e t fa giaw e e vp arip ldqgf hsdity	
taAT.sec	DVPSVWVNGRFRLLDDHITLSEASCTLRIRLLELPLSDQVQILVEMVAKSCIRDAFVEIIV	120
AH-TACM32.sec	DVPSVWVNGRFRLLDDHITLSEASCTLRIRLLELPLSDQVQILVEMVAKSCIRDAFVEIIV	120
taHN.sec	DVPSVWVNGRFRLLDDHITLSEASCTLRIRLLELPLSDQVQILVEMVAKSCIRDAFVEIIV	118
Consenso	dvp vw gr frllddh rle sc k rl lp r e v sg zda ve iv	
taAT.sec	TRGLEGVRCIRPEDIIVNNLYMFVQPYVWVMEFDMQRVGCSAVVARTVRFPEPGALDPTIK	180
AH-TACM32.sec	TRGLEGVRCIRPEDIIVNNLYMFVQPYVWVMEFDMQRVGCSAVVARTVRFPEPGALDPTIK	180
taHN.sec	TRGLEGVRCIRPEDIIVNNLYMFVQPYVWVMEFDMQRVGCSAVVARTVRFPEPGALDPTIK	178
Consenso	trglik rg edi nly pyvw q g avv rtvrr ppga dpt k	
taAT.sec	NLQWGLVVRGMEFADRGATYFELTGGDAHLTEGSEFNIVLVKDEVIYIETRGVIGQVTR	240
AH-TACM32.sec	NLQWGLVVRGMEFADRGATYFELTGGDAHLTEGSEFNIVLVKDEVIYIETRGVIGQVTR	240
taHN.sec	NLQWGLVVRGMEFADRGATYFELTGGDAHLTEGSEFNIVLVKDEVIYIETRGVIGQVTR	238
Consenso	nlqwgdlvrg ea dr p l dgd teg g nivlv g l tp rgvl g tr	
taAT.sec	KSVINAEEREGIEVRVEFVVELATRCDELFEMCSTAGGIMPELITLDCMPEVNGGQIGPDTK	300
AH-TACM32.sec	RTVLEIAPAEGLKTHVTEIFIQALYECDELFEMCSTAGGIMPELIVLLDCMPEVNGGQIGPDTK	300
taHN.sec	RTVLEIAPAEGLKTHVTEIFIQALYECDELFEMCSTAGGIMPELIVLLDCMPEVNGGQIGPDTK	298
Consenso	v a a g v p y cde frc taggimp ldg v g gp t	
taAT.sec	RIWDCYRAMFYDAAYSFEIDVNERNL	326
AH-TACM32.sec	MIWEAYWDLIEDDPQLISEPVIVABLE.	325
taHN.sec	MIWEAYWDLIEDDPQLISEPVIVABLE.	323
Consenso	iw yw h d s y	

Fig. 6