

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 703**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2015 PCT/GB2015/052286**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020695**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2015 E 15749862 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3177715**

54 Título: **Catalizador y uso del mismo**

30 Prioridad:

06.08.2014 GB 201413899

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

25.05.2020

73 Titular/es:

**JOHNSON MATTHEY PUBLIC LIMITED
COMPANY (100.0%)
5th Floor, 25, Farringdon Street
London EC4A 4AB, GB**

72 Inventor/es:

**DOMINGUEZ, BEATRIZ;
SCHELL, URSULA;
KRATZER, CHRISTIAN y
KALTHOFF, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 762 703 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

Catalizador y uso del mismo

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a biocatalizadores para su uso como tales, métodos para la reducción de un sustrato usando un biocatalizador y kits que contienen el biocatalizador.

Antecedentes

El uso de enzimas (biocatalizadores) en síntesis orgánica ofrece una alternativa ecológicamente más sostenible al uso de catalizadores metálicos, además de permitir un alto grado de quimio, regio y/o enantioselectividad en las reacciones catalizadas.

- 10 Se han descrito procesos para la reducción enzimática de derivados de alqueno usando enzimas eno-reductasa de la familia de la "Enzima Amarilla Antigua". Por ejemplo, el documento US 2010/0035315 describe la reducción de sustratos en presencia de la enzima YqjM de *Bacillus subtilis* y las enzimas OPR1 y OPR3 de la planta de tomate, en donde los sustratos son derivados de alquenos a una concentración de 5 mM.

Resumen de la invención

- 15 Los presentes inventores han encontrado que las reacciones de reducción, particularmente la reducción de enlaces carbono-carbono insaturados, pueden realizarse ventajosamente usando un catalizador como se describe en el presente documento. Específicamente, los presentes inventores han encontrado que el catalizador como se describe aquí es particularmente útil para aplicaciones en reacciones industriales, debido a su tolerancia a altas concentraciones de sustrato.
- 20 En un aspecto general, la presente invención proporciona usos del catalizador descrito aquí como catalizador, por ejemplo, para catalizar reacciones de reducción, y procesos para realizar una reacción de reducción que usan el catalizador descrito aquí.

- 25 En un primer desarrollo, la invención proporciona el uso de un catalizador descrito aquí para catalizar una reacción de reducción, en donde la concentración de sustrato es alta. Por ejemplo, la invención proporciona el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción, en donde la concentración de sustrato es al menos 50 mM, al menos 100 mM, al menos 200 mM, al menos 300 mM o al menos 500 mM.

En el presente documento se describe el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

- 30 Aquí se describe el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 1, y en donde la concentración de sustrato es al menos 10 mM, para ejemplo al menos 100 mM, tal como al menos 200 mM o al menos 500 mM. El uso puede comprender poner en contacto el sustrato con el catalizador.

- 35 En un aspecto, se proporciona el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1, y en donde la concentración de sustrato es al menos 50 mM. El uso comprende poner en contacto el sustrato con el catalizador.

- 40 En el presente documento se describe el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 7, y en donde la concentración del sustrato es al menos 50 mM. El uso puede comprender poner en contacto el sustrato con el catalizador.

- 45 En el presente documento se describe el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 9, y en donde la concentración del sustrato es al menos 50 mM. El uso puede comprender poner en contacto el sustrato con el catalizador.

En un segundo desarrollo, la invención proporciona el uso de un catalizador descrito aquí en un método para reducir un sustrato, en donde la concentración de sustrato es alta. Por ejemplo, la invención proporciona el uso de un catalizador en un método para reducir un sustrato, en donde la concentración del sustrato es al menos 50 mM, al menos 100 mM, al menos 200 mM, al menos 300 mM o al menos 500 mM.

- 50 También se proporciona el uso de un catalizador en un método para reducir un sustrato, comprendiendo el método poner en contacto un sustrato con un catalizador, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1. También se proporciona un

- método para reducir un sustrato, comprendiendo el método poner en contacto un sustrato con un catalizador, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1. El método puede comprender opcionalmente poner en contacto un sustrato con un catalizador en presencia de un cosustrato. En una realización, se proporciona el uso de un catalizador en un método para reducir un sustrato, comprendiendo el método poner en contacto un sustrato con un catalizador, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1, y en donde en el método la concentración de sustrato es al menos 50 mM.
- En el presente documento se describe el uso de un catalizador en un método para reducir un sustrato, comprendiendo el método poner en contacto un sustrato con un catalizador, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 7, y en donde en el método la concentración de sustrato es al menos 50 mM.
- En el presente documento se describe el uso de un catalizador en un método para reducir un sustrato, comprendiendo el método poner en contacto un sustrato con un catalizador, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 9, y en donde en el método la concentración de sustrato es al menos 50 mM.
- En una realización, el sustrato comprende un grupo etileno activado, tal como un grupo etileno que es α , β a un grupo acilo, carboxilo, aciloxi, nitro, acilamino o nitrilo.
- En una realización, el sustrato comprende un grupo etileno activado, tal como un grupo etileno que es α , β a un grupo acilo, carboxilo, aciloxi, nitro o acilamino.
- En este documento se describe el catalizador como se describe en el presente documento, ácidos nucleicos que codifican el catalizador, células huésped que contienen un ácido nucleico que codifica el catalizador, células huésped que expresan el catalizador, procesos para producir el catalizador como se describe en el presente documento y preparaciones de catalizador que comprenden el catalizador como descrito aquí. La invención también proporciona un kit que comprende el catalizador, opcionalmente junto con uno o más catalizadores adicionales.
- Resumen de las figuras
- La Figura 1 muestra el cambio en el porcentaje de conversión de una serie de sustratos (mostrados) a sus formas reducidas (no mostradas) a lo largo del tiempo (horas) usando un catalizador de acuerdo con una realización de la invención.
- La Figura 2 muestra el cambio en el porcentaje de conversión de una serie de sustratos (mostrados) a sus formas reducidas (no mostradas) a lo largo del tiempo (horas) a diferentes concentraciones de sustrato, usando un catalizador de acuerdo con una realización de la invención. Cada sustrato se usó a 50 mM (diamantes), 100 mM (cuadrados) y 300 mM (triángulos).
- La Figura 3 muestra el cambio en la actividad del catalizador (U/mg) con el cambio en el pH del medio de reacción usando un catalizador de acuerdo con una realización de la invención. Se utilizó el sustrato citral.
- La Figura 4 muestra el cambio en la actividad del catalizador (U/mg) con el cambio en la temperatura de reacción ($^{\circ}$ C) usando un catalizador de acuerdo con una realización de la invención. Se utilizó el sustrato citral.
- La Figura 5 muestra el cambio en la actividad residual (U/mg) con el tiempo (horas) a diferentes temperaturas de reacción usando un catalizador de acuerdo con una realización de la invención. La reacción se realizó a 30 $^{\circ}$ C (diamantes), 40 $^{\circ}$ C (cuadrados) y 50 $^{\circ}$ C (triángulos).
- La Figura 6 muestra el cambio en el porcentaje de conversión de un sustrato (% de área de pico según lo determinado por GC; sombreado claro) y el cambio en ee del producto reducido (sombreado oscuro) con cambios en el codisolvente del medio de reacción usando un catalizador de acuerdo con una realización de la invención. Cada codisolvente se usó al 5% en volumen.
- La Figura 7 muestra el cambio en el porcentaje de conversión de un sustrato (% de área de pico según lo determinado por GC; sombreado claro) y el cambio en ee del producto reducido (sombreado oscuro) con cambios en el aditivo del codisolvente del medio de reacción usando un catalizador de acuerdo con una realización de la invención. Cada tensoactivo se usó a 0.1 o 0.3% en volumen.
- La Figura 8 muestra el cambio en el porcentaje de conversión de un sustrato a lo largo del tiempo (horas) a diferentes concentraciones de sustrato. El sustrato se usó a 750 mM (diamantes) y 1.500 mM (cuadrados).
- La Figura 9 muestra el cambio en la concentración del producto (mM) con el tiempo (horas) a diferentes concentraciones de sustrato. El sustrato se usó a 750 mM (diamantes) y 1.500 mM (cuadrados).

ES 2 762 703 T3

La Figura 10 muestra el cambio en el porcentaje de conversión de un sustrato a lo largo del tiempo (horas). El sustrato se usó a 730 mM.

La Figura 11 muestra el cambio en la concentración del producto (mM) con el tiempo (horas). El sustrato se usó a 730 mM.

- 5 La Figura 12 muestra los perfiles de conversión de ENE-101 (cuadrados), ENE-102 (diamantes, referencia) y ENE-103 (triángulos, referencia) para diferentes sustratos.

Las Figuras 13A y 13B muestran perfiles de conversión de ENE-101, ENE-102 (referencia) y ENE-103 (referencia) para diferentes sustratos a diferentes concentraciones.

- 10 La Figura 14 muestra el cambio en el porcentaje de conversión de un sustrato a lo largo del tiempo (horas) para ENE-101, ENE-102 (referencia) y ENE-103 (referencia). El sustrato se usó a 300 mM para ENE-102 (círculos, referencia), 750 mM para ENE-101 (triángulos cerrados), ENE-102 (cuadrados, referencia) y ENE-103 (triángulos abiertos, referencia) y 1.5M para ENE-101 (diamantes).

- 15 La Figura 15 muestra el cambio en la concentración del producto (mM) con el tiempo (horas) para ENE-101, ENE-102 (referencia) y ENE-103 (referencia). El sustrato se usó a 300 mM para ENE-102 (círculos, referencia), 750 mM para ENE-101 (triángulos cerrados), ENE-102 (cuadrados, referencia) y ENE-103 (triángulos abiertos, referencia) y 1.5M para ENE -101 (diamantes).

La Figura 16 muestra el cambio en el porcentaje de conversión de un sustrato a lo largo del tiempo (horas) para ENE-101 (triángulos cerrados), ENE-102 (cuadrados, referencia) y ENE-103 (triángulos abiertos, referencia). El sustrato se usó a 730 mM.

- 20 La Figura 17 muestra el cambio en la concentración del producto (mM) con el tiempo (horas) para ENE-101 (triángulos cerrados), ENE-102 (cuadrados, referencia) y ENE-103 (triángulos abiertos, referencia). El sustrato se usó a 730 mM.

La Figura 18 muestra una alineación de secuencia múltiple Clustal Omega (1.2.1) de SEQ ID NOs: 1, 7 (referencia) y 9 (referencia).

Secuencias

- 25 Los catalizadores para uso en la presente invención se describen en este documento con referencia a los números de identificación de secuencia que se enumeran a continuación. Las secuencias se describen en el listado de secuencias.

SEQ NO:1	ID	Secuencia de aminoácidos del catalizador (secuencia de aminoácidos ENE-101)
SEQ NO:2	ID	Catalizador que codifica la secuencia de ácidos nucleicos (que codifica la SEQ ID NO: 1)
SEQ NO:3	ID	Secuencia de ácidos nucleicos, codificación optimizada por codones, catalizador codificador (que codifica la SEQ ID NO: 1)
SEQ NO:4	ID	Secuencia de aminoácidos del catalizador, incluida la etiqueta T7
SEQ NO:5	ID	Secuencia de aminoácidos del catalizador, que incluye la etiqueta His y la etiqueta T7
SEQ NO:6	ID	Catalizador que codifica la secuencia de ácidos nucleicos que incluye la etiqueta His y la etiqueta T7 (que codifica la SEQ ID NO: 5)
SEQ NO:7	ID	Secuencia de aminoácidos del catalizador (secuencia de aminoácidos ENE-102, referencia)
SEQ NO:8	ID	Catalizador que codifica la secuencia de ácidos nucleicos (que codifica la SEQ ID NO: 7, referencia)

SEQ NO:9	ID	Secuencia de aminoácidos del catalizador (secuencia de aminoácidos ENE-103, referencia)
SEQ NO:10	ID	Catalizador que codifica la secuencia de ácidos nucleicos (que codifica la SEQ ID NO: 9, referencia)

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención proporciona el uso de un catalizador en una reacción en sustrato. Como se describe con más detalle a continuación, el catalizador es adecuado para usar en una reacción de reducción, tal como la reducción de un grupo etileno activado. El catalizador permite la producción de un producto de reacción con altos rendimientos, por ejemplo, más del 90% de conversión, y/o con alta estereoselectividad, por ejemplo, más del 99% ee. El catalizador puede usarse a altas concentraciones de sustrato, por ejemplo, a 50, 100 y 300 mM. De hecho, los inventores han establecido que el catalizador puede usarse a concentraciones de sustrato tan altas como 750 y 1.500 mM.

10 La presente invención proporciona el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción, en donde la concentración de sustrato es alta. La presente invención proporciona el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción en la que la concentración de sustrato es alta, y en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con una de las secuencias de aminoácidos como se establece en Figura 18.

15 La presente invención proporciona el uso de un catalizador como catalizador de reducción, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1. Aquí se describe el uso de un catalizador como catalizador de reducción, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 7. Aquí se describe el uso de un catalizador como catalizador de reducción, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 9. El uso puede ser uso como catalizador de hidrogenación.

20 La presente invención proporciona el uso de un catalizador como catalizador de reducción, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1. Aquí se describe el uso de un catalizador como catalizador de reducción, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 7. Aquí se describe el uso de un catalizador como catalizador de reducción, en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 9. El uso puede ser uso como catalizador de hidrogenación.

25 La presente invención proporciona el uso de un catalizador como catalizador de reducción en donde el catalizador es un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En el presente documento se describe el uso de un catalizador como catalizador de reducción en donde el catalizador es un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En el presente documento se describe el uso de un catalizador como catalizador de reducción en donde el catalizador es un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. El uso puede ser uso como catalizador de hidrogenación.

30 Los presentes inventores han demostrado que los catalizadores descritos en este documento son capaces de catalizar reacciones en presencia de altas concentraciones de sustrato. La inhibición de la actividad enzimática por las altas concentraciones de sustrato o producto es a menudo un problema importante en la ampliación de los procesos enzimáticos. Los catalizadores, usos y métodos descritos aquí son, por lo tanto, ventajosos para la ampliación del proceso.

35 La presente invención proporciona el uso de un catalizador como se describe en el presente documento para catalizar una reacción de reducción, en la que la concentración de sustrato es alta. Por ejemplo, la invención proporciona el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción, en donde la concentración del sustrato es al menos 50 mM, al menos 100 mM, al menos 200 mM, al menos 300 mM, al menos 500 mM o a al menos 1500 mM. El catalizador es un catalizador como se describe en el presente documento, por ejemplo, el catalizador puede ser un polipéptido que comprende secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. El catalizador puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

40 En una realización, la invención proporciona el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción, en donde la concentración de sustrato es al menos 50 mM y en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

En una realización, la invención proporciona el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción, en donde la concentración de sustrato es al menos 100 mM y en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ. ID NO: 1.

5 En una realización, la invención proporciona el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción, en donde la concentración de sustrato es al menos 50 mM y en donde el catalizador es un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

En una realización, la invención proporciona el uso de un catalizador para catalizar una reacción de reducción, en donde la concentración de sustrato es al menos 100 mM y en donde el catalizador es un polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

10 Catalizador – Estructura

[0031] El catalizador es un polipéptido. Los catalizadores de polipéptidos se conocen como enzimas y, por lo tanto, el catalizador es una enzima. Las enzimas también se conocen como biocatalizadores. Más específicamente, el catalizador es una reductasa. En particular, el catalizador es una reductasa capaz de reducir un sustrato que tiene un componente 2-ciclo-hexen-1-ona o 2-ciclopenten-1-ona. El catalizador es capaz de usar NADH como cofactor. El catalizador es una enzima dependiente de flavina.

15 El catalizador puede ser una enzima que pertenece al grupo conocido como "enzimas amarillas antiguas". Utilizando la nomenclatura del Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), el catalizador es una enzima perteneciente a la clase 1 (oxidoreductasas). El catalizador puede ser una enzima que pertenece a EC 1.3 (cuyo grupo incluye oxidoreductasas que actúan sobre el grupo de donantes CH-CH). El catalizador puede ser una enzima que pertenece a EC 1.3.1 (cuyo grupo usa NADH o NADPH como cofactor). El catalizador puede ser una enzima que pertenece a EC 1.3.1.42 (cuyo grupo incluye reductasas de 12-oxofitodienoato).

20 El catalizador puede ser un polipéptido recombinante, es decir, el catalizador puede haberse expresado a partir de una secuencia de ácidos nucleicos recombinante, como se discute con más detalle a continuación. El catalizador puede haberse expresado a partir de un ácido nucleico como se proporciona aquí. El catalizador puede haberse expresado a partir de la secuencia de ácidos nucleicos establecida como SEQ ID NO: 3.

25 Como alternativa, el catalizador puede ser un polipéptido natural. El catalizador puede ser una reductasa que es expresada por un gen endógeno (nativo) en una bacteria.

30 El catalizador puede ser una enzima expresada por la fitobacteria *Acidovorax avenae*. El catalizador puede ser una reductasa expresada por *A. avenae*. Específicamente, el catalizador puede ser una reductasa expresada por *A. avenae* depositada como ATCC 19860 (Lucas et al., 2011). El polipéptido identificado por el número de acceso F0Q098 (versión 1 en la base de datos UniProt) es una reductasa codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de *A. avenae* identificada por el número de acceso ADX43981.1 (versión 1, EMBL-EBI European Nucleotide Archive, Lucas et al., 2011).

35 La secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de F0Q098. La secuencia de ácidos nucleicos establecida como SEQ ID NO: 2 es la secuencia de ácidos nucleicos de ADX43981.1.

40 En este documento se describe un catalizador que puede ser una enzima expresada por *Chromobacterium violaceum*. El catalizador puede ser una reductasa expresada por *C. violaceum*. Específicamente, el catalizador puede ser una reductasa expresada por *C. violaceum* depositado como ATCC 12472. El polipéptido identificado por el número de acceso Q7NSC5 es una reductasa codificada por *C. violaceum* (versión 1, Uniprot, lanzado el 15 de diciembre de 2003).

La secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de Q7NSC5.

45 En este documento se describe un catalizador que puede ser una enzima expresada por una especie de *Bacillus*. El catalizador puede ser una reductasa expresada por una especie de *Bacillus*. Específicamente, el catalizador puede ser una reductasa expresada por *Bacillus* sp. NRRL B-14911. El polipéptido identificado por el número de acceso Q2B6D5 es una reductasa codificada por *Bacillus* sp. NRRL B-14911 (versión 1, Uniprot, lanzado el 4 de abril de 2006).

La secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de Q2B6D5.

50 La Figura 18 muestra una alineación de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7 (referencia) y SEQ ID NO: 9 (referencia). En la Figura 18, y en otra parte de esta solicitud, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se denomina ENE-101, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se denomina ENE-102 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se denomina ENE-103.

El catalizador puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 50% de identidad con la SEQ ID NO: 1. El catalizador puede ser un polipéptido que comprende una

consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente el 99% de similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 9. El catalizador puede ser un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene un 100% de similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 9.

El catalizador puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia y/o similitud con la SEQ ID NO: 1 como se establece anteriormente. El polipéptido puede comprender uno o más aminoácidos adicionales. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender además una etiqueta de afinidad. La etiqueta de afinidad puede ser útil para purificar el catalizador. Tales etiquetas de afinidad son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la etiqueta de afinidad puede ser una etiqueta de polihistidina ("etiqueta His"), para purificar el catalizador usando una columna de níquel, puede ser una etiqueta de epítipo T7 (etiqueta T7) para purificar la proteína usando una columna que comprende un anticuerpo anti-etiqueta T7, o puede ser una etiqueta de glutatión-S-transferasa ("etiqueta GST"), para purificar el catalizador usando una columna de glutatión. Una etiqueta de afinidad puede ubicarse en el extremo N o en el extremo C del polipéptido. Alternativa o adicionalmente, el polipéptido puede comprender además una secuencia guía en el extremo N-terminal. La secuencia guía puede ser útil para dirigir la secreción y/o la orientación intracelular del polipéptido en un sistema de expresión recombinante. Las secuencias líder también se conocen como péptidos señal y son bien conocidas en la técnica. Alternativa o adicionalmente, el polipéptido puede comprender además una etiqueta tal como una etiqueta fluorescente.

El catalizador puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia y/o similitud con la SEQ ID NO: 1 más uno o más aminoácidos adicionales, como se establece anteriormente. El catalizador puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 1. Específicamente, el catalizador puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 1 más una etiqueta T7 N-terminal, tal como el polipéptido establecido como SEQ ID NO: 4. El catalizador puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 1 más una etiqueta His N-terminal y una etiqueta T7, tal como el polipéptido establecido como SEQ ID NO: 5.

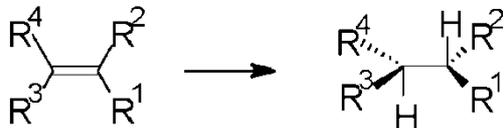
Catalizador – Función

El catalizador es una reductasa. El catalizador es capaz de catalizar la reducción de un sustrato como se define aquí. Específicamente, el catalizador es capaz de reducir un doble enlace carbono-carbono insaturado. En particular, el catalizador puede ser capaz de catalizar la reacción establecida en el siguiente esquema de reacción:



donde cada uno de -R¹ a -R⁴ es como se define con más detalle a continuación, por ejemplo, en presencia de un cosustrato.

En ciertas realizaciones de la invención, el catalizador puede ser capaz de catalizar la reacción establecida en el siguiente esquema de reacción:



donde cada uno de -R¹ a -R⁴ es como se define con más detalle a continuación, por ejemplo, en presencia de un cosustrato.

La actividad del catalizador se puede medir fotométricamente, por ejemplo, realizando la reacción en presencia de NADH como cofactor y midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nM causada por la oxidación de NADH.

En una realización, el catalizador de la invención es una enzima que tiene actividad en la reducción del sustrato en presencia de un cofactor de NADH.

La cantidad de una enzima se puede expresar en términos de su actividad usando unidades enzimáticas. Una unidad de enzima (U) es la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto. Típicamente, el número de unidades enzimáticas presentes en una preparación de catalizador se analiza usando un sustrato de referencia, por ejemplo, para proporcionar U/mg de preparación de catalizador. Una U del catalizador de la invención se puede definir como la cantidad de catalizador que catalizará 1 μmol de NADH a NAD por minuto a pH 7 a 22°C, por ejemplo, en donde el sustrato de referencia es 1-octeno-3-ona. El sustrato de referencia puede estar presente a una concentración

de 0.98 mM en la mezcla de ensayo. La reacción de NADH a NAD puede controlarse usando el cambio de absorbancia a 340 nm, usando técnicas conocidas por el experto en la materia.

5 La actividad del catalizador en unidades enzimáticas se puede usar para expresar la cantidad de enzima presente en una preparación de catalizador, que puede proporcionar el catalizador en una forma relativamente cruda como se describe a continuación.

(El katal expresa la actividad enzimática usando unidades de base SI, donde un katal es la cantidad de enzima que convierte 1 mol de sustrato por segundo, y por lo tanto 1 U es equivalente a 1/60 microkatal).

Por ejemplo, el número de unidades enzimáticas presentes en una preparación de catalizador puede determinarse de acuerdo con el procedimiento de ensayo expuesto a continuación.

10 Se incuban dos cubetas que contienen 980 µL de solución A (solución 1 mM de 1-octen-3-ona en regulador de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0) a 22°C durante al menos 5 minutos, para proporcionar una cubeta de prueba y una cubeta en blanco. La reacción se inicia en la cubeta de prueba agregando 10 µL de solución B (NADH 15 mM en H₂O) y 10 µL de solución C (solución de enzima (por ejemplo, enzima liofilizada) en H₂O; 0.8 mg de preparación de catalizador por ml de H₂O) y mezclando a fondo. Se añaden 10 µl de solución B y 10 µl de H₂O a la cubeta en blanco y se mezclan bien. Se determina la disminución de la absorbancia durante 1 minuto a 340 nm a 22°C. (Si la disminución no es lineal, la solución enzimática (solución C) debe diluirse con H₂O. ΔA₃₄₀ min⁻¹ se determina utilizando la velocidad lineal máxima tanto para la cubeta de prueba como para la cubeta en blanco. Actividad enzimática en U/mg de catalizador la preparación se determina usando la siguiente fórmula:

$$\Delta A_{340} \text{ min}^{-1} \text{ prueba} - \Delta A_{340} \text{ min}^{-1} \text{ blanco} / (6.2 \times 0.01 \times 0.8)$$

20 donde $6.2 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ es el coeficiente de extinción molar para NADH a 340 nm, 0.01 es el volumen de solución enzimática en ml y 0.8 es la masa de preparación de catalizador en mg por ml (y puede adaptarse según en cualquier dilución de la Solución C).

25 Los catalizadores como se describen en el presente documento son reductasas. Pueden catalizar la reducción de 3-metilciclohex-2-en-1-ona (el sustrato que se muestra en las entradas 4 a 6 de la Tabla 1) para generar un producto que tiene un valor ee de 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más. Aquí, el catalizador puede usarse en el método expuesto en el Procedimiento Experimental 1 o el Procedimiento Experimental 2, como se describe aquí.

30 Los catalizadores que son polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 1 y que comprenden una o más adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 pueden catalizar la reducción de 3-metilciclohex-2-en-1-ona (el sustrato que se muestra en las entradas 4 a 6 de la Tabla 1) para generar un producto que tenga un valor ee de 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más. Aquí, el catalizador puede usarse en el método expuesto en el Procedimiento Experimental 1 o el Procedimiento Experimental 2, como se describe aquí.

35 Los catalizadores que son polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 7 y que comprenden una o más adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 pueden catalizar la reducción de 3-metilciclohex-2-en-1-ona (el sustrato que se muestra en las entradas 4 a 6 de la Tabla 1) para generar un producto que tenga un valor ee de 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más. Aquí, el catalizador puede usarse en el método expuesto en el Procedimiento Experimental 1 o el Procedimiento Experimental 2, como se describe aquí.

40 Los catalizadores como se describen en el presente documento son reductasas. Pueden catalizar la reducción de 2-metilciclopent-2-en-1-ona (el sustrato que se muestra en las entradas 7 a 9 de la Tabla 1) para dar un producto con una tasa de conversión del 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más. Aquí, el catalizador puede usarse en el método expuesto en el Procedimiento experimental 1 o el Procedimiento experimental 2, como se describe en la sección Experimental.

45 Los catalizadores que son polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 1 y que comprenden una o más adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 pueden catalizar la reducción de 2-metilciclopent-2-en-1-ona (el sustrato que se muestra en las entradas 7 a 9 de la Tabla 1) para dar un producto con una tasa de conversión del 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más. Aquí, el catalizador puede usarse en el método establecido en el Procedimiento Experimental 1 o 2, como se describe en la sección Experimental.

55 En el presente documento se describen catalizadores que son polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 50% idéntica a la SEQ ID NO: 7 y que comprenden una o más adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, que puede catalizar la reducción de 2-metilciclopent-2-en-1-ona (el sustrato que se muestra en las entradas 7 a 9 de la Tabla 1) para dar un producto con una tasa de conversión del 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más,

o 99.9% o más. Aquí, el catalizador puede usarse en el método expuesto en el Procedimiento experimental 1 o el Procedimiento experimental 2, como se describe en la sección Experimental.

5 En este documento, se describen catalizadores que son polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 50% idéntica a la SEQ ID NO: 9 y que comprenden una o más adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, que puede catalizar la reducción de 2-metilciclopent-2-en-1-ona (el sustrato que se muestra en las entradas 7 a 9 de la Tabla 1) para dar un producto con una tasa de conversión del 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más. Aquí, el catalizador puede usarse en el método expuesto en el Procedimiento experimental 1 o el Procedimiento experimental 2, como se describe en la sección Experimental.

10 Los catalizadores como se describen en el presente documento son reductasas que tienen alta tolerancia al sustrato. Pueden catalizar la reducción de 2-metilciclopent-2-en-1-ona (el sustrato que se muestra en las entradas 7 a 9 de la Tabla 1) cuando la concentración del sustrato es 50 mM para dar un producto con una tasa de conversión del 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más. Aquí, el catalizador puede usarse en el método expuesto en el Procedimiento experimental 1 o el Procedimiento experimental 2, como se describe en la sección Experimental. El tiempo de reacción puede ser de 18 horas. El catalizador puede ser capaz de dar un producto con una tasa de conversión del 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más en las "condiciones de reacción de prueba" establecidas a continuación.

20 Los catalizadores como se describen en el presente documento son reductasas que tienen una alta tolerancia al sustrato. Pueden catalizar la reducción de 2-metilciclopent-2-en-1-ona (el sustrato que se muestra en las entradas 7 a 9 de la Tabla 1) cuando la concentración de sustrato es 100 mM para dar un producto con una tasa de conversión del 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más. Aquí, el catalizador puede usarse en el método expuesto en el Procedimiento experimental 1 o el Procedimiento experimental 2, como se describe en la sección Experimental. El tiempo de reacción puede ser de 18 horas. El catalizador puede ser capaz de dar un producto con una tasa de conversión del 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más en las "condiciones de reacción de prueba" establecidas a continuación.

30 Los catalizadores como se describen en el presente documento son reductasas que tienen alta tolerancia al sustrato. Pueden catalizar la reducción de 2-metilciclopent-2-en-1-ona (el sustrato que se muestra en las entradas 7 a 9 de la Tabla 1) cuando la concentración de sustrato es 300 mM para dar un producto con una tasa de conversión del 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más. Aquí, el catalizador puede usarse en el método expuesto en el Procedimiento experimental 1 o el Procedimiento experimental 2, como se describe en la sección Experimental. El tiempo de reacción puede ser de 18 horas. El catalizador puede ser capaz de dar un producto con una tasa de conversión del 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más en las "condiciones de reacción de prueba" establecidas a continuación.

35 Las "condiciones de reacción de prueba" pueden ser regulador fosfato 250 mM pH 7, NAD⁺ 1.1 mM, D-glucosa 30 mM, 10 U/ml de GDH, a 35°C. El tiempo de reacción puede ser de 3, 6 o 18 horas.

40 La persona experta puede distinguir los catalizadores de la presente descripción, que tienen una alta tolerancia al sustrato y, por lo tanto, son adecuados para los usos y métodos descritos en el presente documento, con respecto a los catalizadores que no tienen una alta tolerancia al sustrato. Un catalizador con alta tolerancia al sustrato tiene las capacidades funcionales establecidas anteriormente. Por el contrario, un catalizador que no tiene una alta tolerancia al sustrato no tiene esas capacidades funcionales. Un catalizador que no tiene alta tolerancia al sustrato puede catalizar la reducción de 2-metilciclopent-2-en-1-ona (el sustrato que se muestra en las entradas 7 a 9 de la Tabla 1) cuando la concentración del sustrato es 50 mM para dar un producto con una tasa de conversión del 20% o menos, 10% o menos, 5% o menos o 2% o menos. Un catalizador que no tiene una alta tolerancia al sustrato puede catalizar la reducción de 2-metilciclopent-2-en-1-ona cuando la concentración del sustrato es 20 mM o menos para dar un producto con una tasa de conversión del 30% o más, 40% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más, y cuando la concentración de sustrato es 50 mM o más para dar un producto con una tasa de conversión de 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos, 5% o menos o 2% o menos. Un catalizador que no tiene una alta tolerancia al sustrato puede catalizar la reducción de 2-metilciclopent-2-en-1-ona cuando la concentración del sustrato es 20 mM o menos para dar un producto con una tasa de conversión del 30% o más, 40% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 99.9% o más, y cuando la concentración de sustrato es 300 mM o más para dar un producto con una tasa de conversión de 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos, 5% o menos o 2% o menos. Aquí el catalizador puede usarse en el método establecido en el Procedimiento Experimental 1 o 2, como se describe en la sección Experimental, o en las "condiciones de prueba" descritas anteriormente. El tiempo de reacción puede ser de 18 horas.

Ácidos nucleicos

En este documento se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos que codifican el catalizador. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN. El ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. El catalizador puede estar codificado por una secuencia de ácidos nucleicos como se establece en SEQ ID NO: 2, que es una secuencia de ácidos nucleicos

del genoma de *A. avenae* (Lucas et al., 2011). La secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Debido a que el código genético es degenerado (más de un codón puede codificar un aminoácido), la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 puede alterarse para proporcionar secuencias de ácidos nucleicos adicionales que también codifiquen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

5 En este documento se describe un catalizador que puede estar codificado por una secuencia de ácidos nucleicos como se establece en SEQ ID NO: 8. La secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. Debido a que el código genético es degenerado (más de un codón puede codificar un aminoácido), la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 puede alterarse para proporcionar secuencias de ácidos nucleicos adicionales que también codifiquen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

10 En este documento se describe un catalizador que puede estar codificado por una secuencia de ácidos nucleicos como se establece en la SEQ ID NO: 10. La secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 10 codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Debido a que el código genético es degenerado (más de un codón puede codificar un aminoácido), la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 10 puede alterarse para proporcionar secuencias de ácidos nucleicos adicionales que también codifiquen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 .

15 Se puede introducir una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador en una célula huésped, para proporcionar una célula huésped recombinante que expresa el catalizador. El catalizador puede proporcionarse en una célula proporcionando una célula huésped que expresa el catalizador. El catalizador puede proporcionarse en una forma aislada proporcionando una célula huésped que expresa el catalizador, que expresa el catalizador en la célula huésped y que aísla el catalizador. Una célula huésped puede ser una célula procariota como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* o una especie de *Pseudomonas*. Una célula huésped puede ser una célula eucariota, por ejemplo, una célula de levadura como *Saccharomyces cerevisiae* o una célula de mamífero como una célula HeLa o una célula CHO.

20 Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador puede optimizarse para la expresión en una célula huésped recombinante. Debido a que el código genético puede variar entre organismos (la preferencia del codón puede variar entre los organismos), la expresión de un polipéptido deseado en una célula huésped específica puede mejorarse alterando el ácido nucleico que codifica el polipéptido de acuerdo con la preferencia del codón de la célula huésped. La secuencia de ácidos nucleicos de *A. avenae* SEQ ID NO: 2 se alteró para proporcionar SEQ ID NO: 3, para mejorar la expresión del catalizador en una célula huésped, tal como *E. coli*. Debido a que el código genético es degenerado, la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3 puede alterarse para proporcionar secuencias de ácidos nucleicos adicionales que también codifican el catalizador en una célula huésped como *E. coli*. Debido a que el uso de codones puede variar entre organismos, las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3 pueden alterarse para proporcionar ácidos nucleicos adicionales adecuados para expresar el catalizador en otras células huésped. Debido a que el catalizador puede ser una variante de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante de SEQ ID NO: 1 puede ser adecuada para expresar el catalizador en una célula huésped. De manera similar, las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10 pueden alterarse para proporcionar ácidos nucleicos adicionales adecuados para expresar catalizadores en otras células huésped, y porque el catalizador puede ser una variante de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 puede ser adecuada para expresar el catalizador en una célula huésped.

30 Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 3. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene 100% de identidad con la SEQ ID NO: 3. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos como se establece en SEQ ID NO: 3.

35 En este documento se describe una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador que puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 8. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad con la SEQ ID NO: 8. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una identidad del 100% con la SEQ ID NO: 8. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos como se establece en SEQ ID NO: 8.

40 Se describe en el presente documento una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador que puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 10. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o al menos

aproximadamente 99% de identidad con la SEQ ID NO: 10. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene 100% de identidad con la SEQ ID NO: 10. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el catalizador puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos como se establece en SEQ ID NO: 10.

- 5 El ácido nucleico que codifica el catalizador puede estar en forma aislada y/o purificada, o libre o sustancialmente libre de material con el que está naturalmente asociado, tal como secuencias libres o sustancialmente libres de ácido nucleico que flanquean la SEQ ID NO: 2 en el genoma de *A. avenae*. En este documento se describe un ácido nucleico que codifica el catalizador que puede estar en forma aislada y/o purificada, o libre o sustancialmente libre de material con el que está naturalmente asociado, tal como libre o sustancialmente libre de secuencias de ácidos nucleicos que flanquean la SEQ ID NO: 8 en el genoma de *C. violaceum*. En este documento se describe un ácido nucleico que codifica el catalizador que puede estar en forma aislada y/o purificada, o libre o sustancialmente libre de material con el que está naturalmente asociado, tal como libre o sustancialmente libre de secuencias de ácidos nucleicos que flanquean la SEQ ID NO: 10 en *Bacillus* sp. genoma.

15 En general, los ácidos nucleicos que codifican el catalizador pueden obtenerse modificando la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3. Las técnicas recombinantes tales como la mutagénesis dirigida al sitio se pueden usar para modificar la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 para proporcionar secuencias adicionales de ácido nucleico que codifican el catalizador. Dichas secuencias adicionales de ácido nucleico pueden codificar variantes de SEQ ID NO: 1. Los ácidos nucleicos que codifican el catalizador pueden obtenerse por modificación de la SEQ ID NO: 8. Se pueden usar técnicas recombinantes tales como mutagénesis dirigida al sitio para modificar la SEQ ID NO: 8 para proporcionar secuencias adicionales de ácido nucleico que codifican el catalizador. Dichas secuencias adicionales de ácido nucleico pueden codificar variantes de SEQ ID NO: 7. Los ácidos nucleicos que codifican el catalizador pueden obtenerse por modificación de la SEQ ID NO: 10. Se pueden usar técnicas recombinantes tales como mutagénesis dirigida al sitio para modificar la SEQ ID NO: 10 para proporcionar secuencias de ácidos nucleicos adicionales que codifican el catalizador. Dichas secuencias adicionales de ácido nucleico pueden codificar variantes de SEQ ID NO: 9.

25 La presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos establecida como SEQ ID NO: 3. La presente invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3, en donde el ácido nucleico codifica el catalizador. La presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3, en donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 1, cuyo polipéptido es una reductasa.

35 En este documento se describe un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos establecida como SEQ ID NO: 8. La presente invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con la SEQ ID NO: 8, en donde el nucleico el ácido codifica el catalizador. La presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con la SEQ ID NO: 8, en donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 7, cuyo polipéptido es una reductasa.

40 En este documento se describe un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos establecida como SEQ ID NO: 10. La presente invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con la SEQ ID NO: 10, en donde el ácido codifica el catalizador. La presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con la SEQ ID NO: 10, en donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50% de identidad con la SEQ ID NO: 9, cuyo polipéptido es una reductasa.

Vectores, células huésped y métodos para la producción del catalizador

50 Se puede incorporar un ácido nucleico que codifica el catalizador en un vector replicable. El vector puede usarse para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Por lo tanto, un ácido nucleico que codifica un catalizador puede producirse introduciendo un ácido nucleico que codifica un catalizador en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible y haciendo crecer la célula huésped en condiciones que provocan la replicación del vector.

55 El ácido nucleico que codifica el catalizador puede estar operativamente unido a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión del catalizador por la célula huésped. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el catalizador puede estar en un vector de expresión. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el catalizador puede estar en un plásmido o un cromosoma. El término "operativamente unido" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de

control "operativamente unida" a una secuencia de codificación se liga de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Opcionalmente, el codón ttg N terminal en SEQ ID NO: 2 puede reemplazarse con un codón de inicio tal como atg.

5 Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, por ejemplo, fago fagémido o baculoviral, cósmidos, YAC, BAC o PAC, según corresponda. Los vectores incluyen vectores de terapia génica, por ejemplo, vectores basados en adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus (tales como VIH o MLV) o vectores de virus alfa.

10 Los vectores pueden proporcionarse con un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión del catalizador y opcionalmente un regulador del promotor. El vector puede ser un plásmido de copia baja, un plásmido de copia media o un plásmido de copia alta. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo, un gen de resistencia a la ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia a la neomicina para un vector de mamífero. Los vectores pueden usarse in vitro, por ejemplo, para la producción de ARN o usarse para transfectar o transformar una célula huésped. Son bien conocidos los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes.

15 Los vectores pueden incluir otras secuencias tales como promotores o potenciadores para conducir la expresión del ácido nucleico insertado. Un promotor puede ser un promotor inducible, de modo que la expresión del catalizador puede iniciarse o potenciarse agregando un inductor al medio de crecimiento de la célula huésped. Por ejemplo, el promotor puede basarse en el operón lac, para el que IPTG (isopropil-beta-D-tio-galactósido) es un inductor. Alternativamente, un promotor puede ser un promotor constitutivamente activo. Un promotor puede ser un promotor fuerte.

20 Los vectores pueden incluir otras secuencias de ácidos nucleicos para que el catalizador se produzca como una proteína de fusión (por ejemplo, una proteína de fusión que comprende el catalizador y una etiqueta de afinidad), y/o secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia guía para que el polipéptido producida en la célula huésped es secretada por la célula.

25 Se proporcionan en el presente documento células huésped, tales como las mencionadas anteriormente, que pueden cultivarse en condiciones para provocar la expresión del catalizador. El catalizador puede proporcionarse dentro de una célula huésped. De esta manera, el catalizador puede usarse in vivo en una reacción de reducción, es decir, el catalizador puede usarse en una reacción de reducción intracelular. Alternativamente, la expresión del catalizador puede ser seguida por el aislamiento del catalizador de la célula huésped. El catalizador puede aislarse usando técnicas electroforéticas y/o cromatográficas. El catalizador puede aislarse, por ejemplo, expresando el catalizador como una proteína de fusión que incluye una etiqueta de afinidad y usando un agente que se une a la etiqueta de afinidad para recuperar la proteína de fusión. El agente puede estar unido a una columna de Sepharose, por ejemplo. Una etiqueta de afinidad se puede escindir de la proteína después de que se haya aislado.

Preparación del catalizador

El catalizador se puede proporcionar en forma pura o sustancialmente pura. El catalizador en forma pura, o sustancialmente pura, se separa de otras moléculas o componentes celulares que acompañan naturalmente a una proteína (por ejemplo, ribosomas, componentes de la membrana celular).

40 El catalizador puede proporcionarse en una forma relativamente cruda como preparación de catalizador, por ejemplo, la preparación de catalizador puede ser un lisado o lisado clarificado de células recombinantes que expresan el catalizador. La preparación del catalizador puede ser un homogeneizado o una pasta de células recombinantes que expresan el catalizador.

45 El catalizador puede estar comprendido en una célula huésped. El catalizador puede proporcionarse en forma libre o en forma inmovilizada. Inmovilizado del catalizador se puede unir a un vehículo inerte como un polvo de celulosa o un polímero sintético como el polietileno (Lalonde and Margolin, 2002).

50 En este documento se proporcionan métodos para producir el catalizador, que incluyen la expresión de un ácido nucleico que codifica el catalizador en una célula huésped y el aislamiento del catalizador de la célula huésped. El método puede incluir la lisis de la célula huésped para proporcionar un lisado celular, y puede incluir además eliminar los restos de la célula huésped (por ejemplo, por centrifugación) para proporcionar un lisado celular clarificado. La etapa de someter a lisis la célula huésped puede usar un regulador de lisis que comprende mononucleótido de flavina (FMN), por ejemplo, el regulador de lisis puede comprender aproximadamente 1-50 μM FMN, o aproximadamente 5-25 μM FMN, o aproximadamente 20 μM FMN. Adicional o alternativamente, la etapa de someter a lisis la célula huésped puede usar un regulador de lisis que contiene MgSO_4 , por ejemplo, el regulador de lisis puede comprender aproximadamente 1-50 mM MgSO_4 , aproximadamente 1-5 mM MgSO_4 o aproximadamente 5 mM MgSO_4 . El regulador de lisis puede comprender FMN y MgSO_4 .

Se puede eliminar agua del catalizador o preparación del catalizador para proporcionar el catalizador en forma liofilizada. El catalizador puede proporcionarse como un liofilizado. El catalizador o la preparación del catalizador pueden congelarse.

5 La cantidad de catalizador en la preparación de catalizador se puede expresar como unidades de enzima (U) por mg de preparación de catalizador, por ejemplo, como unidades de enzima por mg de liofilizado.

10 La cantidad de catalizador en la preparación de catalizador puede ser al menos aproximadamente 0.25 U por mg de preparación de catalizador, al menos aproximadamente 1 U por mg de preparación de catalizador o al menos aproximadamente 3 U por mg de preparación de catalizador (por ejemplo, determinada usando el método de ensayo descrito anteriormente). La cantidad de catalizador en la preparación de catalizador puede ser como máximo aproximadamente 5 U por mg de preparación de catalizador, como máximo aproximadamente 10 U por mg de preparación de catalizador, como máximo aproximadamente 20 U por mg de preparación de catalizador o como máximo aproximadamente 50 U por mg de preparación de catalizador (por ejemplo, determinado usando el método de ensayo descrito anteriormente). La preparación del catalizador puede ser un liofilizado que comprende al menos aproximadamente 0.25 U por mg de liofilizado, al menos aproximadamente 1 U por mg de liofilizado o al menos aproximadamente 3 U por mg de liofilizado (por ejemplo, determinado usando el método de ensayo descrito anteriormente). La cantidad de catalizador en el liofilizado puede ser como máximo aproximadamente 5 U por mg de liofilizado, como máximo aproximadamente 10 U por mg de liofilizado, como máximo aproximadamente 20 U por mg de liofilizado o como máximo aproximadamente 50 U por mg de liofilizado (por ejemplo, determinado usando el método de ensayo descrito anteriormente).

20 La cantidad de catalizador en la preparación puede estar en un rango seleccionado de las cantidades superior e inferior dadas anteriormente, por ejemplo, en el rango de 1 a 20 U por mg de preparación de catalizador.

25 La presente invención proporciona una preparación de catalizador, que comprende el catalizador como se define aquí. La preparación de catalizador puede comprender al menos una cierta cantidad de catalizador (definido en términos de U de catalizador por mg de preparación de catalizador) como se definió anteriormente. Por ejemplo, la preparación de catalizador puede comprender un catalizador que es un polipéptido que comprende un aminoácido que tiene al menos aproximadamente un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 en la que la cantidad de catalizador en la preparación de catalizador es de al menos 0.25 U por mg de catalizador preparación Aquí se describe una preparación de catalizador que puede comprender un catalizador que es un polipéptido que comprende un aminoácido que tiene al menos aproximadamente un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 en la que la cantidad de catalizador en la preparación de catalizador es de al menos 0.25 U por mg de preparación del catalizador Aquí se describe una preparación de catalizador que puede comprender un catalizador que es un polipéptido que comprende un aminoácido que tiene al menos aproximadamente un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9 en la que la cantidad de catalizador en la preparación de catalizador es de al menos 0.25 U por mg de preparación del catalizador.

Similitud e identidad de secuencia

35 La identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos y la identidad de la secuencia de ácidos nucleicos pueden medirse usando herramientas de software de bioinformática estándar, tales como las herramientas de software EMBOSS, o BLAST, disponibles gratuitamente. Los parámetros predeterminados se usan generalmente. Por ejemplo, la alineación de secuencia por pares de agujas EMBOSS puede usarse para determinar la identidad de secuencia de aminoácidos. La alineación de secuencia por pares EMBOSS Needle, que usa el algoritmo Needleman-Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)), puede usarse para determinar la similitud de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, usando parámetros predeterminados y usando una matriz de puntuación BLOSUM, como la matriz de puntuación BLOSUM62. Los parámetros predeterminados se pueden usar con una penalización de creación de brechas = 12 y una penalización de extensión de brechas = 4. Se puede preferir el uso de GAP pero se pueden usar otros algoritmos, por ejemplo, BLAST o TBLASTN (que utilizan el método de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (que utiliza el método de Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), o el algoritmo Smith-Waterman (Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), generalmente empleando parámetros por defecto.

50 Como se discutió anteriormente, el catalizador es un polipéptido que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, y que es capaz de catalizar la reducción de un sustrato. Los catalizadores que tienen menos del 50% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 son capaces de catalizar la reducción de un sustrato y, por lo tanto, muchos polipéptidos que tienen al menos un 50% de identidad de secuencia de aminoácidos también son capaces de catalizar la reducción de un sustrato. Por ejemplo, la enzima conocida como YqjM de *Bacillus subtilis* (EC 1.6.99.1, entrada UniProt P54550) tiene aproximadamente un 30% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y es capaz de reducir ciertos derivados alquenos, la enzima codificada por el gen OYPR1 del tomate (EC 1.3.1.42, Uniprot Q9XG54) tiene aproximadamente un 42% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y es capaz de reducir ciertos derivados de alquenos, y la enzima codificada por el gen OYPR3 de tomate (EC 1.3.1.42, Uniprot Q9FEW9) tiene aproximadamente 42% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y es capaz de reducir ciertos derivados de alqueno (véase el documento US 2010/0035315). Los catalizadores que son polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 1 pueden comprender una o más adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Los catalizadores pueden comprender una o varias adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Los catalizadores pueden comprender 1-150, 1-100, 1-50, 1-20 o 1-10 adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

5 En este documento se describen catalizadores que son polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 7 y pueden comprender una o más adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

10 Los catalizadores pueden comprender una o varias adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. Los catalizadores pueden comprender 1-150, 1-100, 1-50, 1-20 o 1-10 adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

15 En este documento se describen catalizadores que son polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 9 y pueden comprender una o más adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Los catalizadores pueden comprender una o varias adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Los catalizadores pueden comprender 1-150, 1-100, 1-50, 1-20 o 1-10 adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

20 Los catalizadores de la invención pueden ser variantes de los polipéptidos mostrados en la SEQ ID NO: 1. Las variantes pueden diferir de las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 1 mediante la inserción, adición, sustitución o eliminación de 1 aminoácido, 2, 3, 4, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50, 50-100, o más de 150 aminoácidos. Se pueden hacer variantes usando métodos de clonación molecular de rutina.

25 La persona experta es consciente de cómo hacer tales variantes y es consciente de los factores que pueden afectar la capacidad funcional del catalizador. Por ejemplo, la persona experta entiende que una variante con relativamente pocas inserciones, adiciones, eliminaciones y sustituciones de aminoácidos es relativamente más probable que retenga la funcionalidad de los catalizadores mostrados en las SEQ ID NOs: 1, 7 y 9 que una variante que tiene relativamente muchas sustituciones de aminoácidos. El experto también entiende que una variante que tiene una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos es más probable que retenga funcionalidad que una variante que tiene una o más sustituciones no conservadoras.

30 Una alineación de SEQ ID NOs: 1, 7 y 9 se muestra en la Figura 18. La información con respecto a los aminoácidos conservados (mostrados por *), aminoácidos muy similares (mostrados por :) y aminoácidos débilmente similares (mostrados por .) entre SEQ ID NOs: 1, 7 y 9 tal como se presenta en la Figura 18 sugiere posiciones de aminoácidos en las que puede ser deseable evitar sustituciones. Las posiciones de aminoácidos que no se conservan, o que no son similares o solo son débilmente similares, pueden ser más susceptibles de sustitución mientras conservan la funcionalidad. Por lo tanto, la persona experta puede generar variantes de los polipéptidos mostrados en la SEQ ID Nos: 1, 7 y 9. El experto en la materia puede determinar si un polipéptido variante es adecuado para usar como catalizador de acuerdo con la presente invención usando, por ejemplo, los métodos descritos aquí. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras de aminoácidos, en las cuales un aminoácido de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 está sustituido por un aminoácido que tiene características similares. Por ejemplo, un aminoácido hidrófobo (por ejemplo, Leu) se sustituye por otro aminoácido hidrófobo (por ejemplo, Ile). Los aminoácidos y las sustituciones conservadoras se muestran en la tabla a continuación.

Aminoácido	Sustitución conservadora	Aminoácido	Sustitución conservadora
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln; Glu
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Cys	Ser	Ser	Thr
Gln	Asn	Thr	Ser
Glu	Asp	Trp	Tyr

Aminoácido	Sustitución conservadora	Aminoácido	Sustitución conservadora
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu; Val		

Uso

El catalizador de la invención puede usarse como tal, por ejemplo, como catalizador en una reacción *ex vivo*, tal como *in vitro*. Una reacción *in vitro* en este contexto se refiere a una reacción extracelular o libre de células.

5 Se ha encontrado que el catalizador de la invención tiene uso como catalizador en una reacción de reducción. En una realización, la reacción de reducción es la reducción de un enlace insaturado, tal como un enlace carbono-carbono insaturado, tal como un enlace etileno. Se puede decir que el catalizador tiene actividad de hidrogenación, o actividad de hidrogenación de transferencia. Por lo tanto, el catalizador de la invención es generalmente útil en la reducción de compuestos que contienen alqueno, por ejemplo, para producir el producto reducido correspondiente.

10 En una realización, el catalizador de la invención encuentra uso como catalizador en la reducción de un sustrato como se describe aquí, tal como un compuesto de fórmula (I). El catalizador de la invención puede denominarse reductasa. Por lo tanto, el catalizador generalmente encuentra uso en reacciones de reducción y más específicamente en reacciones de hidrogenación. Por lo tanto, el catalizador puede catalizar una reacción de reducción que formalmente resulta en la adición de hidrógeno a través de un doble enlace carbono-carbono (C=C). Típicamente, la fuente de hidruro en las reacciones de reducción descritas en este documento es proporcionada por un cofactor, tal como NADH.

15 En una realización, el catalizador de la invención se proporciona dentro de una célula, para reacción intracelular, como se indicó anteriormente.

En un aspecto, se proporciona el uso del catalizador de la SEQ ID NO. 1 como catalizador, opcionalmente junto con un cofactor. Aquí se describe el uso del catalizador de SEQ ID NO: 7 como catalizador, opcionalmente junto con un cofactor. Aquí se describe el uso del catalizador de SEQ ID NO: 9 como catalizador, opcionalmente junto con un cofactor.

20 En una realización, el catalizador tiene actividad de reducción, tal como actividad de hidrogenación, tal como hidrogenación de un doble enlace carbono-carbono (C=C).

En una realización, el catalizador tiene actividad eno reductasa.

25 En una realización, el catalizador de la invención encuentra uso en un método como se describe aquí.

Métodos

En un aspecto, la presente invención proporciona un método de síntesis, el método comprende la etapa de hacer reaccionar un sustrato en presencia del catalizador de la invención para proporcionar de ese modo un producto. El método puede comprender poner en contacto el sustrato con el catalizador.

30 El método puede ser una reducción y, por lo tanto, el sustrato se reduce en presencia de un catalizador y un agente reductor.

En una realización, la reacción es una reacción estereoespecífica.

Opcionalmente, el método comprende además la etapa de aislar el producto, tal como aislar el producto del catalizador y cualquier sustrato restante. La etapa de aislamiento puede incluir el aislamiento del producto de los subproductos, como los productos que son estereoisómeros, incluidos los enantiómeros, del producto. El paso de aislamiento también puede incluir el paso de aislar el producto del medio de reacción.

35 En una realización, el método comprende la etapa de aislar el catalizador. El catalizador puede reutilizarse posteriormente en un método adicional de la invención, según se requiera.

40 El catalizador de la invención puede permitir la preparación de un producto, tal como un producto reducido, con alto rendimiento. Los ejemplos trabajados muestran que el catalizador puede usarse en una reacción de reducción para proporcionar un producto con un rendimiento de 50% o más, tal como 60% o más.

Los métodos de la invención pueden realizarse en agua, típicamente con otro disolvente ("codisolvente") presente. El medio de reacción puede ser monofásico o bifásico.

En una realización, el codisolvente está presente en una cantidad de como máximo 10% en volumen, como máximo 15% en volumen o como máximo 25% en volumen.

- 5 En una realización, el codisolvente está presente en una cantidad de al menos 0.5% en volumen, al menos 1% en volumen o al menos 2% en volumen.

En una realización, el codisolvente está presente en una cantidad de alrededor del 5% en volumen.

- 10 El codisolvente puede seleccionarse del grupo que consiste en tolueno, xileno, etanol, isopropanol, éter dietílico, tetrahidrofurano, 2-metil tetrahidrofurano, acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetonitrilo, metil tert-butil éter (MTBE), isopropanol, dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO).

En una realización, el codisolvente es tolueno.

La reacción se puede realizar en un medio de reacción donde el agua está presente en cantidades muy bajas, como 5% v/v o menos con respecto al volumen total de disolvente. Esto es menos preferido.

La reacción puede realizarse a temperatura ambiente o a una temperatura elevada.

- 15 La reacción puede realizarse a una temperatura que sea como máximo 35°C, como máximo 40°C, como máximo 45°C como máximo 50°C, o como máximo 55°C. Como se esperaba, temperaturas muy altas y sostenidas están asociadas con la pérdida de actividad enzimática.

La reacción puede realizarse a una temperatura que es al menos 30°C, al menos 25°C, al menos 20°C, al menos 15°C o al menos 0°C.

- 20 Los inventores han encontrado que se obtienen resultados óptimos cuando el catalizador se usa a una temperatura que está en un rango seleccionado de las cantidades superiores e inferiores dadas anteriormente, por ejemplo, en el rango de 20 a 45°C o en el rango de 20 a 35°C.

Una reacción en un medio acuoso se puede realizar a un pH dentro de un rango limitado.

En una realización, el pH del medio de reacción es como máximo 8, como máximo 9 o como máximo 10.

- 25 En una realización, el pH del medio de reacción es al menos 5, al menos 6, al menos 6.5 o al menos 7.

Los inventores han encontrado que se obtienen resultados óptimos cuando el catalizador se usa a un pH que está en un rango seleccionado de las cantidades superiores e inferiores dadas anteriormente, por ejemplo, en el rango de pH 6.5 a 8.

- 30 El pH del medio de reacción puede referirse al pH del medio de reacción al comienzo de la reacción. Adicional o alternativamente, el pH puede referirse al pH del punto final de la reacción.

Se puede proporcionar un regulador en el medio de reacción para mantener el pH del medio de reacción con un intervalo seleccionado entre los valores superior e inferior dados anteriormente.

- 35 Los presentes inventores han establecido que el catalizador de la invención puede usarse a altas concentraciones de sustrato. Los ejemplos trabajados demuestran el uso del catalizador a concentraciones de sustrato de 300 mM, 750 mM y 1.500 mM. En contraste, el trabajo en el documento US 2010/0035315 demuestra el uso de un biocatalizador solo a concentraciones de sustrato de 5 mM como máximo.

- 40 En una realización, el sustrato está presente a una concentración de al menos 0.1 mM, al menos 0.5 mM, al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 50 mM, al menos 100 mM, al menos 200 mM, al menos 300 mM, al menos 400 mM, al menos 500 mM, al menos 750 mM, al menos 1.000 mM, al menos 1.500 mM, al menos 2.000 mM, al menos 2.500 mM, o al menos 3,000 mM.

En una realización, el sustrato está presente a una concentración de como máximo 50 mM, como máximo 100 mM, como máximo 200 mM, como máximo 300 mM, como máximo 500 mM, como máximo 1.000 mM, como máximo 1.500 mM, como máximo 2.000 mM, como máximo 2.500 mM, como máximo 3.000 mM, como máximo 3.500 mM, como máximo 4.000 mM, como máximo 4.500 mM o como máximo 5.000 mM.

- 45 Los inventores han encontrado que se obtienen resultados óptimos cuando el sustrato se usa a una concentración que está en un rango seleccionado de las cantidades superiores e inferiores dadas anteriormente, por ejemplo, en el rango de 5 mM a 1.500 mM.

ES 2 762 703 T3

La concentración de sustrato puede estar en el rango de 50 mM a 5.000 mM, 50 mM a 3.000 mM, 50 mM a 1.500 mM, 50 mM a 1.000 mM, 50 mM a 500 mM, 100 mM a 5.000 mM, 100 mM a 3.000 mM, 100 mM a 1.500 mM, 100 mM a 1.000 mM, 500 mM a 5.000 mM, 500 mM a 3.000 mM, 500 mM a 1.500 mM, o 500 mM a 1.000 mM.

5 En una realización, el sustrato está presente a una concentración de al menos 10 mg/L, al menos 50 mg/L, al menos 100 mg/L, al menos 500 mg/L, al menos 1.000 mg/L, al menos 5 g/L, al menos 10 g/L, al menos 20 g/L, al menos 30 g/L, al menos 40 g/L, al menos 50 g/L, al menos 75 g/L al menos 100 g/L, al menos 150 g/L, al menos 200 g/L, al menos 250 g/L, o al menos 300 g/L.

10 En una realización, el sustrato está presente a una concentración de como máximo 5 g/L, como máximo 10 g/L, como máximo 20 g/L, como máximo 30 g/L, como máximo 50 g/L, como máximo 100 g/L, como máximo 150 g/L, como máximo 200 g/L, como máximo 250 g/L, como máximo 300 g/L, como máximo 350 g/L, como máximo 400 g/L, como máximo 450 g/L, o como máximo 500 g/L.

La cantidad de preparación de catalizador requerida en una reacción puede ser pequeña en relación con la cantidad de sustrato presente y baja en su concentración en el medio de reacción. Por ejemplo, se pueden usar 0.4 g/l de preparación de catalizador.

15 En una realización, el catalizador puede estar presente a una concentración de como máximo 5 g/l, como máximo 10 g/l como máximo 50 g/l, como máximo 100 g/l.

En una realización, la preparación de catalizador puede estar presente a una concentración de al menos 0.05 g/L, al menos 0.10 g/L, al menos 0.25 g/L, al menos 0.5 g/L o al menos 1.0 g/L.

En una realización, la preparación del catalizador está presente a aproximadamente 0.4 g/l.

20 En una realización, la preparación del catalizador está presente a aproximadamente 0.4 g/l.

Como se discutió anteriormente, la cantidad de una enzima se puede expresar en términos de su actividad usando unidades enzimáticas, U. U se puede determinar usando el ensayo descrito anteriormente. De manera similar, la concentración de una enzima puede expresarse como U/ml.

25 En una realización, la enzima puede estar presente a una concentración de como máximo 500 U/ml, como máximo 300 U/ml, como máximo 200 U/ml o como máximo 150 U/ml. En algunas realizaciones, la enzima puede estar presente a una concentración de como máximo 50 U/ml.

En una realización, la enzima puede estar presente a una concentración de al menos 1 U/ml, al menos 5 U/ml, al menos 10 U/ml o al menos 20 U/ml. En algunas realizaciones, la estera enzimática debe estar presente a una concentración de al menos 50 U/ml.

30 Los inventores han encontrado que se obtienen resultados óptimos cuando la enzima se usa en una cantidad que está en un rango seleccionado de las cantidades superiores e inferiores proporcionadas anteriormente.

35 La cantidad de enzima requerida en una reacción puede ser pequeña en relación con la cantidad de sustrato presente. Por ejemplo, aproximadamente 70 U de enzima pueden estar presentes por mmol de sustrato, o aproximadamente 140 U de enzima pueden estar presentes por mmol de sustrato. Por ejemplo, 1250 U de enzima pueden estar presentes por mmol de sustrato.

En una realización, la enzima está presente en una cantidad de como máximo 5000 U por mmol de sustrato, como máximo 2500 U por mmol de sustrato, como máximo 2000 U por mmol de sustrato o como máximo 1500 U por mmol de sustrato. En algunas realizaciones, la enzima está presente en una cantidad de como máximo 500 U por mmol de sustrato, como máximo 300 U por mmol de sustrato o como máximo 200 U por mmol de sustrato.

40 En una realización, la enzima está presente en una cantidad de al menos 1 U por mmol de sustrato, al menos 10 U por mmol de sustrato, al menos 20 U por mmol de sustrato, al menos 40 U por mmol de sustrato, o en al menos 60 U por mmol de sustrato.

Los inventores han encontrado que se obtienen resultados óptimos cuando la enzima se usa en una cantidad que está en un rango seleccionado de las cantidades superiores e inferiores proporcionadas anteriormente.

45 La reacción puede llevarse a cabo durante un tiempo suficiente para permitir la generación de una cantidad deseable de material. Posteriormente, la mezcla de reacción se puede procesar para aislar el material del producto.

En una realización, el tiempo de reacción es al menos 1 hora, al menos 2 horas o al menos 3 horas. En una realización, el tiempo de reacción es como máximo 18 horas, como máximo 24 horas, como máximo 36 horas, como máximo 48 horas, como máximo 72 horas, como máximo 96 horas o como máximo 120 horas.

50 El final de la reacción puede ser el punto en donde se separan el catalizador y el producto.

La reacción puede considerarse completa cuando el rendimiento del producto deseado no aumenta sustancialmente con el tiempo.

En una realización, la reacción se realiza in vitro.

La reacción puede realizarse de forma continua o discontinua.

5 Sustrato

El catalizador de la invención puede usarse como tal en la reacción de un sustrato. El sustrato reacciona en presencia de los catalizadores para producir un producto. El sustrato puede reaccionar con un cosustrato para producir el producto.

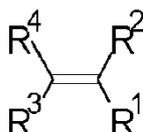
10 En una realización, el sustrato es un compuesto que tiene una funcionalidad que puede reducirse. El producto de la reacción es, por lo tanto, un producto reducido.

En una realización, el sustrato tiene un enlace etileno (C=C). El producto de la reacción puede ser un sustrato que tiene un enlace etileno reducido, por ejemplo -CH-CH-.

15 En una realización, el enlace etileno es un enlace etileno activado. Por lo tanto, el enlace etileno puede ser α , β a un grupo activador. Los ejemplos de grupos activadores incluyen grupos acilo, carboxilo, aciloxi, nitro, acilamino y nitrilo. Por lo tanto, el sustrato puede tener un grupo acilo, aciloxi, nitro, acilamino o nitrilo α , β -insaturado.

En una realización, el enlace etileno es un enlace etileno activado. Por lo tanto, el enlace etileno puede ser α , β a un grupo activador. Los ejemplos de grupos activadores incluyen grupos acilo, carboxilo, aciloxi, nitro o acilamino. Por lo tanto, el sustrato puede tener un grupo acilo, aciloxi, nitro o acilamino α , β -insaturado.

En una realización, el sustrato es un compuesto de fórmula (I):



20

dónde:

- R^1 se selecciona independientemente de acilo, carboxilo, aciloxi, nitro, acilamino y nitrilo;
- R^2 se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, amino, hidroxilo y oxi, y $-R^2$ se selecciona opcionalmente adicionalmente de amido o nitrilo;

25 • R^3 es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, amino, hidroxilo, oxi, carboxi, aciloxi, nitrilo y acilamino,

o donde $-R^1$ es acilo, aciloxi o acilamino, $-R^1$ y $-R^2$ pueden formar un anillo que contiene el grupo acilo, aciloxi o acilamino o $-R^1$ y $-R^3$ pueden formar un anillo que contiene el grupo acilo, aciloxi o acilamino; y

30 • R^4 es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, amino, hidroxilo, oxi, carboxi, aciloxi, nitrilo y acilamino,

y cada grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo y arilo está opcionalmente sustituido;

o $-R^2$ y $-R^4$ juntos pueden formar un anillo no sustituido o sustituido.

En una realización, R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en acilo, carboxi, aciloxi, nitro y acilamino.

35 En una realización, $-R^1$ es acilo o aciloxi. Los inventores han establecido que los sustratos que tienen tales grupos presentes en $-R^1$ se reducen con buen rendimiento y/o con un alto exceso enantiomérico en presencia del catalizador de la invención.

En una realización, $-R^1$ es acilamino.

40 En una realización, $-R^2$ es hidrógeno. En esta realización, $-R^3$ y $-R^4$ pueden diferir. Cuando este es el caso, los inventores han descubierto que la reacción de reducción proporciona un producto que tiene un exceso enantiomérico particularmente alto. En una realización, R^2 es alquilo no sustituido o sustituido, por ejemplo, alquilo no sustituido. En una realización, $-R^2$ junto con $-R^4$ y los átomos de carbono a los que están unidos forman un anillo carbocíclico no sustituido o sustituido, tal como un anillo carbocíclico no sustituido o sustituido. Por ejemplo, el anillo puede ser un

anillo de ciclopenteno o ciclohexeno, tal como un anillo de ciclohexeno no sustituido o sustituido. El anillo puede incluir opcionalmente un heteroátomo.

En una realización, -R² es amido, por ejemplo, donde -R¹ es aciloxi.

- 5 En una realización, donde -R¹ es un grupo acilo, aciloxi o acilamino, -R¹ y -R² pueden formar un anillo que contiene el grupo acilo, aciloxi o acilamino. En esta realización, el doble enlace carbono-carbono es exo al anillo. El anillo puede tener 4-7 átomos en el anillo, como 5 o 6 átomos en el anillo. Donde -R¹ es aciloxi, un átomo del anillo es un átomo de oxígeno, y donde -R¹ es acilamino, un átomo del anillo es un átomo de nitrógeno.

En una realización, -R¹ y -R², junto con el átomo de carbono al que están unidos (el carbono α), forman un anillo de ciclopentenona o ciclohexenona. Aquí, -R¹ es acilo.

- 10 Donde -R¹ y -R² forman un anillo, ese anillo está opcionalmente sustituido.

En una realización, -R³ se selecciona de hidrógeno, y alquilo, cicloalquilo, alquenilo y alquinilo no sustituido o sustituido.

En una realización, -R³ es hidrógeno.

En una realización, -R³ se selecciona de alquilo, cicloalquilo, alquenilo y alquinilo no sustituido o sustituido.

En una realización, -R³ se selecciona de alquilo no sustituido o sustituido.

- 15 En una realización, donde -R¹ es un grupo acilo, aciloxi o acilamino, -R³ y -R¹ forman un anillo no sustituido o sustituido que contiene el grupo acilo, aciloxi o acilamino. El anillo puede tener 4-7 átomos en el anillo, como 5 o 6 átomos en el anillo. Por ejemplo, el anillo puede ser un ciclopentenona o ciclohexenona.

- 20 El anillo puede incluir opcionalmente un heteroátomo. El anillo puede estar provisto de un sustituyente oxo (=O) a un átomo de carbono del anillo. Un átomo de anillo de carbono oxo-sustituido puede unirse con un grupo acilamino para formar una imida cíclica (-C(O)-NR-C(O)-). Se muestra que tales estructuras son sustratos activos en el presente de la enzima SYE-4 (véase Iqbal et al.), por ejemplo.

En una realización, -R₃ y -R₁ forman un anillo no sustituido o sustituido cuando -R¹ contiene un grupo acilo.

Cuando un grupo alquenilo o alquinilo está presente en cualquiera de -R², -R³ y -R⁴, preferiblemente no está conjugado con el enlace insaturado que es α , β al grupo -R¹.

- 25 En una realización, -R⁴ se selecciona de hidrógeno y alquilo, cicloalquilo, alquenilo y alquinilo no sustituido o sustituido. En una realización, -R⁴ es hidrógeno.

En una realización, uno de -R², -R³ y -R⁴ no es hidrógeno.

En una realización, uno de -R², -R³ y -R⁴ es hidrógeno. Por ejemplo, -R² es hidrógeno o -R³ es hidrógeno.

En una realización, R³ y -R⁴ son hidrógeno.

- 30 En una realización, el sustrato no es 12-oxo-cis-10,15-fitodienoato.

Los inventores han descubierto que ENE-103 tiene poca actividad para los sustratos 3-metil-2-ciclopentenona y 3-metil-2-ciclohexenona. Sin embargo, se cree que esta pequeña actividad está asociada con estos sustratos específicos, y ENE-103 exhibe actividad catalizadora con otros sustratos relacionados estructuralmente, como se muestra en los ejemplos trabajados del presente caso.

- 35 En una realización, el sustrato no es 3-metil-2-ciclopentenona o 3-metil-2-ciclohexenona, por ejemplo, cuando el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 9, tal como donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

En una realización, -R⁴ es hidrógeno. En una realización, -R² se selecciona independientemente de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, amino, hidroxilo y oxi.

- 40 Estas realizaciones pueden aplicarse donde -R¹ es acilo, y -R¹ y -R³ juntos forman un anillo que contiene el grupo acilo, tal como un anillo de ciclopentenona.

- 45 En una realización, el sustrato no contiene un grupo nitrilo (-CN). Por ejemplo, cada uno de -R¹, -R³ y -R⁴ no es nitrilo. Por consiguiente, el grupo -R¹ puede seleccionarse independientemente de acilo, carboxi, aciloxi, nitro y acilamino. El grupo -R³ puede seleccionarse independientemente de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, amino, hidroxilo, oxi, carboxi, aciloxi y acilamino. El grupo -R⁴ puede seleccionarse independientemente de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, amino, hidroxilo, oxi, carboxi, aciloxi y acilamino.

Un grupo alquilo puede referirse a un grupo alquilo saturado C_{1-20} , que es lineal o ramificado. El grupo alquilo puede ser un grupo alquilo C_{1-4} , C_{1-6} o C_{1-10} . Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo y 1-metiletilo (isopropilo).

5 Un grupo alqueno puede referirse a un grupo alqueno C_{2-20} , que es lineal o ramificado. El grupo alqueno puede ser un grupo alqueno C_{2-4} , C_{2-6} o C_{2-10} . Los ejemplos de grupos alqueno incluyen etenilo y propenilo. Cuando el grupo alqueno se proporciona con un sustituyente, se puede proporcionar un etileno del grupo α , β al sustituyente. Un grupo alqueno puede poseer uno o más enlaces insaturados.

10 Un grupo alquino puede referirse al grupo alquino C_{2-20} , que es lineal o ramificado. El grupo alquino puede ser un grupo alquino C_{2-4} , C_{2-6} o C_{2-10} . Los ejemplos de grupos alquino incluyen etinilo y propinilo. Un grupo alquino puede poseer uno o más enlaces insaturados.

Un grupo cicloalquilo puede referirse a un grupo cicloalquilo C_{6-10} . Los ejemplos de grupos alquilo incluyen ciclohexilo y ciclopentilo.

En una realización, el grupo cicloalquilo está opcionalmente insaturado.

15 El grupo cicloalquilo puede ser parte de un sistema de anillo fusionado. En un sistema condensado, el grupo cicloalquilo tiene un sistema de anillo que comprende dos o más anillos condensados, en donde un anillo del sistema de anillo condensado puede ser un anillo aromático (que incluye un anillo heteroaromático), y el grupo está unido al resto de la molécula por un átomo de anillo no aromático (es decir, un átomo de anillo que forma parte de un anillo no aromático que forma parte del sistema de anillo). Por lo tanto, el sistema de anillo fusionado está conectado a través de un átomo del anillo del cicloalquilo. Ejemplos de sistemas fusionados incluyen tetralinilo e indanilo. El sistema de anillo fusionado puede estar opcionalmente sustituido en cualquier átomo de anillo disponible.

20 Un grupo heterociclilo puede referirse a un grupo heterociclilo C_{5-10} . El grupo heterociclilo puede ser un grupo heterociclilo C_{5-7} , C_{5-6} o C_6 . El grupo heterociclilo contiene uno o más, tales como uno o dos heteroátomos seleccionados de N, O y S. El grupo heterociclilo puede estar conectado a través de un átomo de carbono del anillo o un átomo de nitrógeno del anillo, donde esté presente. Un átomo de anillo de nitrógeno puede ser un grupo NH, o el átomo de anillo de nitrógeno puede estar sustituido. Un átomo de anillo de azufre puede ser un grupo -S-, -S(O)- o -S(O)₂-.

Los ejemplos de grupos heterociclilo incluyen tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, pirrolidina, 1,4-dioxano, morfolina, tiomorfolina, piperazina, piperidina y 1,4-diazepina.

30 El grupo heterociclilo puede ser parte de un sistema de anillo condensado. En un sistema fusionado, el grupo heterociclilo tiene un sistema de anillo que comprende dos o más anillos fusionados, en donde un anillo del sistema de anillo fusionado puede ser un anillo aromático (que incluye un anillo heteroaromático), y el grupo está unido al resto de la molécula por un átomo de anillo no aromático (es decir, un átomo de anillo que forma parte de un anillo no aromático que forma parte del sistema de anillo). Por lo tanto, el sistema de anillo fusionado está conectado a través de un átomo de anillo del anillo heterociclilo. Los ejemplos incluyen indolinilo, indolilo y dihidrobenzofuranilo, cromanilo y 2,3-dihidro-1,4-benzodioxinilo. El sistema de anillo fusionado puede estar opcionalmente sustituido en cualquier átomo de anillo disponible.

Un grupo arilo puede referirse a un grupo carboarilo o heteroarilo C_{5-14} .

Un grupo carboarilo puede ser un grupo carboarilo C_{6-14} o C_{6-10} .

Los ejemplos de grupos carboarilo incluyen fenilo y naftilo.

40 El grupo carboarilo puede ser parte de un sistema de anillo fusionado. En un sistema condensado, el grupo carboarilo tiene un sistema de anillo que comprende dos o más anillos condensados, en donde al menos un anillo del sistema de anillo condensado es un anillo aromático (que incluye un anillo heteroaromático), y el grupo está unido al resto de la molécula por un átomo de anillo aromático (es decir, un átomo de anillo que forma parte de un anillo aromático que forma parte del sistema de anillo). Por lo tanto, el sistema de anillo fusionado está conectado a través de un átomo de anillo del anillo aromático. Los ejemplos incluyen naftilo, indolinilo, indolilo y dihidrobenzofuranilo, cromanilo y 2,3-dihidro-1,4-benzodioxinilo. El sistema de anillo fusionado puede estar opcionalmente sustituido en cualquier átomo de anillo disponible.

Un grupo heteroarilo puede ser un grupo heteroarilo C_{5-14} , C_{5-10} o C_{5-6} .

Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen furanilo, pirrolilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, piridonilo, pirazinilo, quinolinilo e iso-quinolinilo.

50 El grupo heteroarilo puede ser parte de un sistema de anillo fusionado. En un sistema condensado, el grupo heteroarilo tiene un sistema de anillo que comprende dos o más anillos condensados, en donde al menos un anillo del sistema de anillo condensado es un anillo heteroaromático, y el grupo está unido al resto de la molécula por un átomo del anillo heteroaromático (es decir, un átomo del anillo que forma parte de un anillo aromático que forma parte del sistema de anillo). Por lo tanto, el sistema de anillo fusionado está conectado a través de un átomo de anillo del anillo aromático.

El grupo heteroarilo puede estar conectado a través de un átomo de carbono del anillo o un átomo de nitrógeno del anillo, donde esté presente. Los ejemplos incluyen indolilo, benzofuranilo, isobenzofuranilo, benzoxazoilo, purinilo, quinolinilo e iso-quinolinilo.

5 Los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo cicloalquilo, heterociclilo y arilo están opcionalmente sustituidos. Un grupo puede estar mono, di o trisustituido.

Cuando se dice que un grupo está sustituido, puede estar sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste en halo, hidroxilo (-OH), nitro (-NO₂), alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, oxi, tio, amino, acilo, carboxi, aciloxi, oxiacilo, amido y acilamino. Estos grupos se analizan a continuación.

10 Cuando un átomo de anillo de nitrógeno está presente en un grupo heterociclo, ese átomo de anillo puede estar sin sustituir (NH) u opcionalmente sustituido con alquilo, alquenilo, alquini-cicloalquilo, heterociclilo, arilo, acilo y aciloxi, tal como se describe en el presente documento.

Un grupo halo, hidroxilo (-OH), nitro (-NO₂), alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, oxi, tio, amino, acilo, carboxi, aciloxi, oxiacilo, amido y acilamino puede ser un grupo como se describe a continuación.

15 Un grupo acilo es un grupo -C(O)H o -C(O)R, donde -R se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo y arilo sustituidos o no sustituidos.

En una realización, un grupo acilo es -C(O)R.

Cuando un grupo acilo es un sustituyente de un átomo del anillo de nitrógeno, el grupo acilo junto con el átomo del anillo de nitrógeno forma un grupo amido.

20 En una realización, donde -R¹ es un grupo acilo, -R se selecciona de alquilo sustituido o no sustituido.

En una realización, donde -R¹ es un grupo acilo, ese grupo puede ser parte de un anillo formado junto con el grupo -R³. Por ejemplo, -R¹ y -R³, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden formar un anillo ciclohex-2-eno-1-ona o ciclopent-2-en-1-ona.

Un grupo carboxi es -C(O)OH o la forma carboxilato de este grupo.

25 Un grupo aciloxi es un grupo -C(O)OR, donde -R se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo y/o arilo sustituido o no sustituido.

Cuando un grupo acilo es un sustituyente de un átomo del anillo de nitrógeno, el grupo aciloxi junto con el átomo del anillo de nitrógeno forman un grupo carbamato.

30 El grupo -R¹ puede ser un grupo aciloxi. En una realización, -R puede junto con -R³ formar un anillo. En una realización, -R⁶ y -R³ y los átomos a los que están unidos forman un anillo no sustituido o sustituido, donde el anillo tiene 4-8, como 5-7, átomos en el anillo. El anillo puede ser un ciclohexeno o un anillo de ciclopenteno, por ejemplo. El anillo está opcionalmente sustituido.

En una realización, donde -R¹ es un grupo aciloxi, -R se selecciona de alquilo sustituido o no sustituido.

Un grupo halo se selecciona independientemente de -F, -Cl, -I y -Br.

35 Un grupo oxi es un grupo -OR, donde R se selecciona independientemente de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo y arilo.

Un grupo tio es un grupo -SH o SR, donde R se selecciona independientemente de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo y arilo.

40 Un grupo amino es un grupo seleccionado de -NH₂, -NHR y -N(R)₂, donde cada R se selecciona independientemente de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo y arilo, tal como alquilo, cicloalquilo y arilo.

Un grupo oxiacilo es un grupo -OC(O)R, donde -R se selecciona independientemente de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo y arilo sustituidos o no sustituidos.

Un grupo amido es un grupo -NHC(O)R, -NRC(O)R donde -R se selecciona independientemente de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo y arilo sustituido o no sustituido, tal como sustituido o no sustituido alquilo.

45 Un grupo acilamino es un grupo -C(O)NH₂, -C(O)NHR o -C(O)N(R)₂, donde -R se selecciona independientemente de alquilo, alquenilo, alquinilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo, heterociclilo y arilo, o dos grupos R pueden junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos desde un heterociclo de nitrógeno sustituido o no sustituido, que opcionalmente contiene un heteroátomo de anillo adicional. El heterociclo está opcionalmente sustituido con alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo y arilo.

Descrito anteriormente es el grupo -R, que se selecciona de alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclilo y arilo sustituido o no sustituido.

En una realización, -R, cuando está presente, se selecciona de alquilo, alqueno, alquino y cicloalquilo sustituido o no sustituido.

- 5 En una realización, -R, cuando está presente, se selecciona de alquilo y cicloalquilo sustituido o no sustituido, tal como alquilo.

En una realización, -R, cuando está presente, se selecciona de alquilo, alqueno y arilo sustituido o no sustituido.

En una realización, -R, donde está presente, es arilo sustituido o no sustituido.

Un grupo alquilo, alqueno o alquino no está sustituido con un grupo alquilo, alqueno o alquino.

- 10 Cada sustituyente puede estar opcionalmente sustituido adicionalmente.

En una realización, -R² y -R⁴ no son lo mismo. En una realización, -R², -R³ y -R⁴ no son lo mismo.

En una realización, -R², -R³ y -R⁴ no contienen un grupo etileno que sea α , β a un grupo activador, tal como α , β a un grupo acilo, carboxilo, aciloxi o nitro. Aquí, el sustrato tiene solo un grupo de etileno activado y ese es el grupo de etileno que es α , β a -R¹.

- 15 En una realización, el sustrato es un compuesto que tiene un peso molecular de como máximo 500, como máximo, 750 o como máximo 1.000.

En una realización, el sustrato es aciral.

Cosustrato

- 20 En los métodos de la invención, el sustrato puede reaccionar junto con un cosustrato para producir un producto. En una reacción de reducción, el cosustrato puede considerarse como el agente reductor. El agente reductor puede proporcionar formalmente hidrógeno para la reducción. El agente reductor es típicamente un cofactor.

Cofactor

- 25 El catalizador puede usar NAD(P)H como cofactor para proporcionar equivalentes reductores para la reacción de reducción. Por ejemplo, al catalizar la reducción de dobles enlaces carbono-carbono insaturados, el catalizador puede usar equivalentes reductores de NAD(P)H, oxidándolo así a NAD(P)⁺. La relación de cofactor reducido a cofactor oxidado, por ejemplo, la relación de NAD(P)H a NAD(P)⁺, debe ser relativamente alta para favorecer la oxidación del cofactor y la reducción concomitante del sustrato.

- 30 Los cofactores también se conocen como coenzimas, y también se pueden conocer como cosustratos. El término "NAD(P)H" se usa para indicar NADH y/o NADPH, y el término y "NAD(P)⁺" se usa para indicar NAD⁺ y/o NADP⁺. Por ejemplo, un catalizador que usa "NAD(P)H" como cofactor puede usar NADH como cofactor y puede usar NADPH adicional o alternativamente como cofactor.

- 35 En reacciones in vitro, el cofactor reducido puede estar presente en una cantidad estequiométrica con el sustrato. Alternativamente, el cofactor reducido puede estar presente en una cantidad significativamente menor que una cantidad estequiométrica con el sustrato. El cofactor reducido puede regenerarse usando un sistema de regeneración de cofactor reducido, que reduce el cofactor oxidado durante la reacción y, por lo tanto, permite que el cofactor esté presente en una cantidad significativamente menor que una cantidad estequiométrica con el sustrato. Los sistemas de regeneración de cofactores reducidos son conocidos en la técnica. Dichos sistemas pueden comprender un agente reductor opcionalmente junto con una enzima capaz de transferir equivalentes reductores del agente reductor al cofactor oxidado. Los agentes reductores incluyen azúcares, en particular hexosas tales como glucosa, manosa, fructosa, los agentes reductores también incluyen alcoholes oxidables como etanol, propanol e isopropanol, y los agentes reductores también incluyen formiato, fosfito e hidrógeno molecular. Tales sistemas pueden comprender un azúcar como agente reductor opcionalmente con una deshidrogenasa de azúcar compatible para catalizar la transferencia de equivalentes reductores del azúcar al cofactor oxidado. Para NADH como cofactor, un sistema de regeneración de cofactor reducido puede comprender glucosa y glucosa deshidrogenasa (GDH), como se muestra en el Esquema 1. Para NADH como cofactor, un sistema de regeneración de cofactor reducido puede comprender formiato y formiato deshidrogenasa. Para NADPH como cofactor, un sistema de regeneración de cofactor puede incluir glucosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfatasa.

- 45 En reacciones in vivo, cuando el catalizador se proporciona en una célula, las enzimas intracelulares regeneran NAD(P)H reducido. Dichas enzimas pueden ser endógenas o recombinantes. Por ejemplo, las enzimas intracelulares involucradas en la glucólisis, como la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, pueden reducir NAD⁺ a NADH.

El catalizador puede ser una enzima dependiente de flavina. Es decir, el catalizador puede aceptar equivalentes reductores de un cofactor para reducir un doble enlace carbono-carbono insaturado a través de un grupo protésico de mononucleótido flavina (FMN).

Reacción estereoselectiva

- 5 El catalizador de la invención puede usarse para generar productos en los que uno o más, como dos átomos de carbono en el producto, tienen una estereoquímica específica. Por lo tanto, el catalizador de la invención puede usarse ventajosamente para preparar compuestos quirales.

El catalizador de la invención puede usarse para generar un producto que tiene un valor ee de 70% o más, 80% o más, 95% o más, 99% o más.

- 10 Por consiguiente, el catalizador de la invención puede usarse para preparar productos que son predominantemente de un estereoisómero, con una baja cantidad de otro estereoisómero, tal como un enantiómero.

- 15 El catalizador de la invención puede usarse junto con un sustrato que es aquiral. Por lo tanto, el sustrato puede no poseer átomos que tengan centros estereogénicos. Los métodos descritos en este documento permiten la generación de uno o dos centros estereogénicos en el producto. Por lo tanto, el catalizador de la invención puede usarse para impartir quiralidad a partir de un material de partida aquiral.

Se observa que los métodos de reacción descritos en el presente documento no se limitan a métodos de síntesis estereoselectivos. Como se muestra en los ejemplos trabajados, el catalizador de la invención puede usarse para generar altos rendimientos de sustrato reducido. La reducción estereoselectiva de un sustrato puede ocurrir con o sin altos rendimientos de producto.

- 20 Cuando el sustrato contiene un enlace etileno, se entiende que la reducción de ese enlace, usando el catalizador, ocurre con la adición formal de hidrógeno en las caras opuestas (anti) del enlace. En el compuesto de fórmula (I), el enlace etileno se muestra con el grupo $-R^1$ ubicado en la parte inferior derecha. Como se dibuja, la reducción de este enlace en presencia del catalizador puede ocurrir con la adición de un átomo de hidrógeno desde la cara superior (por encima del plano del papel) en el carbono unido a $-R^3$ y $-R^4$, y la adición de un átomo de hidrógeno de la cara inferior (debajo del plano del papel) en el carbono unido a $-R^1$ y $-R^2$.

Por lo tanto, en una realización, la reducción del compuesto de fórmula (I) se produce así:



- 30 La cantidad de un enantiómero o la proporción de enantiómeros en un producto puede determinarse mediante técnicas espectroscópicas estándar, tales como HPLC usando una fase estacionaria quiral. Como se describe en el presente documento, el valor ee para un producto de una reacción de reducción se determinó mediante análisis GC de una mezcla de productos.

- 35 Los inventores han encontrado que se pueden obtener excesos enantioméricos altos donde el átomo de carbono al que están unidos $-R^3$ y $-R^4$ es un átomo de carbono proquiral (un átomo de carbono que se convierte en un átomo de carbono quiral tras la reducción). Por el contrario, cuando el átomo de carbono al que están unidos $-R^1$ y $-R^2$ (el carbono α) es un átomo de carbono proquiral, en algunos casos no se logran excesos enantioméricos elevados. Se cree que esto se debe a la mayor labilidad relativa del átomo de hidrógeno unido al carbono α después de la reducción, lo que puede conducir a reacciones de racemización donde el carbono α es un átomo de carbono quiral (por ejemplo, a través de la forma enolato donde $-R^1$ es acilo). Por consiguiente, cuando se desea un alto exceso enantiomérico, puede preferirse que el átomo de carbono al que están unidos $-R^3$ y $-R^4$ sea un átomo de carbono proquiral. Puede preferirse que el átomo de carbono al que están unidos $-R^1$ y $-R^2$ no sea un átomo de carbono proquiral.

- 40 En particular, los inventores han descubierto que se pueden obtener altos excesos enantioméricos para aquellos compuestos en los que $-R^2$ es hidrógeno y $-R^3$ y $-R^4$ no son hidrógeno ni son lo mismo. Aquí, el carbono al que están unidos $-R^3$ y $-R^4$ puede considerarse como un centro proquiral, ya que se convertirá en un átomo de carbono quiral tras la reducción. Por el contrario, el carbono α que está en $-R^1$ no producirá un centro estereogénico cuaternario tras la reducción, ya que la reacción dará como resultado que este átomo de carbono tenga dos átomos de hidrógeno.

La persona experta comprenderá fácilmente el término átomo de carbono quiral como se usa en el presente documento. Incluye un átomo de carbono que tiene cuatro grupos diferentes unidos al mismo, uno de los cuales puede ser un átomo de hidrógeno.

Kits

- 50 En este documento se describe el catalizador de la invención en un kit.

El kit puede comprender uno o más catalizadores adicionales. Se puede usar un catalizador adicional en una reacción de reducción, tal como la reducción de un grupo etileno como se describe en el presente documento.

Adicional o alternativamente, un catalizador adicional puede usarse para una reacción que no es una reacción de reducción, o no es la reducción de un grupo etileno.

- 5 En una realización, los catalizadores adicionales son biocatalizadores. Por lo tanto, cada catalizador tiene actividad enzimática.

Un catalizador se puede separar espacialmente de otros catalizadores u otros componentes del kit. Por lo tanto, se puede proporcionar un catalizador en un pozo de una placa de pozos, o en un vial separado u otro recipiente.

- 10 Un kit de la presente invención puede ser un kit que tiene un catalizador de reducción junto con uno o más de otros catalizadores, en donde el catalizador de reducción es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1. Aquí se describe un kit que tiene un catalizador de reducción junto con uno o más otros catalizadores, en donde el catalizador de reducción es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 7. Aquí se describe un kit que tiene una reducción catalizador junto con uno o más de otros catalizadores, en donde el catalizador de reducción es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 9.

El kit puede proporcionarse con instrucciones de uso del kit. Opcionalmente, el kit puede estar provisto de reactivos adicionales para usar con un catalizador. Por ejemplo, se pueden proporcionar cofactores, reguladores, disolventes, etc. Se puede proporcionar un regulador en forma concentrada, para su posterior rehidratación.

- 20 Uno o todos los catalizadores adicionales pueden ser un catalizador enzimático.

En una realización, el kit comprende además uno o más catalizadores que tienen una actividad seleccionada del grupo que consiste en actividad transferasa, actividad hidrolasa, actividad liasa, actividad isomerasa y actividad ligasa.

- 25 En una realización, el kit comprende además uno o más catalizadores que tienen una actividad seleccionada del grupo que consiste en actividad de lipasa, actividad de esterasa, actividad de amidasa (que incluye actividad de peptidasa), actividad de glicosidasa, actividad de glicoltransferasa, actividad de epoxidasa, actividad de nitrilasa (incluyendo actividad de nitrilo hidratasa), actividad de hidroxilación, actividad de deshidrogenasa (incluida la actividad de alcohol deshidrogenasa), actividad de dihidroxilación, actividad de oxidación de Baeyer-Villiger, actividad de aldolasa, actividad de oxinitrilasa, actividad de amino-transferasa y actividad de regeneración de cofactor.

- 30 Adicional o alternativamente, el kit comprende un catalizador que tiene una actividad que es una actividad eno reductasa.

En una realización, el kit está provisto de un sustrato para uno o cada uno de los catalizadores en el kit. El sustrato puede proporcionarse como un sustrato de referencia, por ejemplo, para establecer la actividad de los catalizadores dentro del kit.

En una realización, el kit se proporciona con instrucciones para el uso de cada catalizador.

- 35 Otras realizaciones

Todas y cada una de las combinaciones compatibles de las realizaciones descritas anteriormente se describen explícitamente aquí, como si todas y cada una de las combinaciones se recitaran individual y explícitamente.

Varios aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción.

- 40 "y/o" donde se usa en el presente documento debe tomarse como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se estableciera individualmente en este documento.

- 45 A menos que el contexto dicte lo contrario, las descripciones y definiciones de las características expuestas anteriormente no se limitan a ningún aspecto particular o realización de la invención y se aplican por igual a todos los aspectos y realizaciones que se describen.

Ciertos aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán ahora a modo de ejemplo y con referencia a las figuras descritas anteriormente.

Sección experimental

Catalizador

ENE-101 fue expresado en *E. coli* usando técnicas de expresión estándar. La secuencia de ácidos nucleicos optimizada para la expresión de ENE-101 en *E. coli* (SEQ ID NO: 3) se clonó en un vector de expresión estándar para la expresión inducible por IPTG.

5 En algunos experimentos, las secuencias de ácidos nucleicos (sin codón optimizado) que codifican ENE-101 que tienen una o más etiquetas N-terminales (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7) se expresaron y confirmaron que tenían actividad catalítica.

10 Las preparaciones de ENE-101 se produjeron recolectando células, recuperando biomasa y resuspendiendo la biomasa en regulador (fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0), lisando la suspensión y eliminando los restos celulares para proporcionar un lisado celular clarificado. En algunos experimentos, el regulador de lisis contenía 20 μm de FMN (mononucleótido de flavina) y MgSO_4 5 mM. La inclusión de 20 μm de FMN y MgSO_4 5 mM en el regulador de lisis dio como resultado un aumento del 10% en la actividad de ENE-101. El lisado celular clarificado se filtró primero a través de filtros de tamaño de poro de 0.5 μm y 0.2 μm , y luego se concentró adicionalmente por ultrafiltración para proporcionar una preparación ENE-101. Dichas preparaciones de ENE-101 pueden usarse directamente o liofilizarse para su posterior reconstitución y uso. Las preparaciones ENE-101 típicamente comprenden aproximadamente 5 U mg^{-1} de catalizador, determinado por el ensayo descrito anteriormente, usando 1-octeno-3-ona como sustrato de referencia.

15 Para los estudios de actividad, las preparaciones ENE-101 se realizaron usando un vector que expresa la SEQ ID NO: 3.

A continuación se describe el uso de un catalizador de SEQ ID NO: 1. Esto se conoce como ENE-101.

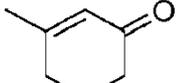
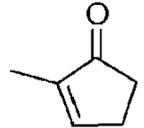
20 Procedimiento Experimental 1

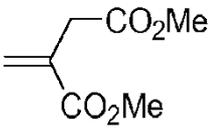
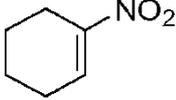
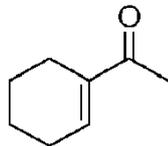
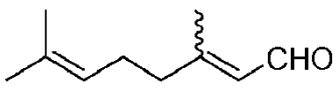
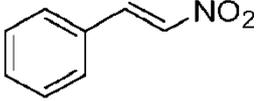
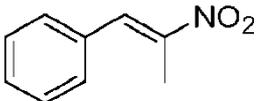
Se añadieron 50 μl de una solución de preparación ENE-101 liofilizada en agua (100 mg/ml; 5 mg de enzima por prueba) a viales de reacción que contenían 900 μl de medio acuoso a pH 7 (regulador de fosfato de potasio 250 mM pH 7, NAD^+ 1.1 mM, D-glucosa 30 mM, GDH 10 U/mL) y 50 μL de solución de sustrato en tolueno (400 mM, concentración final de sustrato 20 mM). Los viales se agitaron a 35°C durante 3, 6 y 18 horas. Después de agregar 1 ml de EtOAc, los viales de reacción se agitaron en vórtex y se centrifugaron. Las muestras de la fase orgánica se analizaron por GC para medir la conversión y ee.

Los resultados se muestran en la Tabla 1

30 Se encontró que los valores de conversión en algunos experimentos eran relativamente bajos en las condiciones de reacción específicas empleadas. Sin embargo, no se observaron productos secundarios, y el sustrato sin reaccionar fue el componente principal restante. Suponiendo que el sustrato puede recuperarse y reutilizarse en reacciones posteriores, el rendimiento del producto puede considerarse relativamente alto.

Tabla 1-Tiempo de reacción, conversión y ee para sustratos en el Procedimiento Experimental 1

Entrada	Substrato	Tiempo (h)	% Conv ^a	% ee	Estereo. ^c
1		3	2.7	>99.9	S
2		6	4.0	>99.9	S
3		18	10.2	>99.9	S
4		3	4.0	>99.9	S
5		6	5.7	>99.9	S
6		18	18.7	>99.9	S
7		3	91.4	51.4 ^b	
8		6	100	34.6 ^b	
9		18	100	8.0 ^b	

Entrada	Substrato	Tiempo (h)	% Conv ^a	% ee	Estereo. ^c
10		3	27.6	>99.9	
11		6	42.2	>99.9	
12		18	91.1	>99.9	
13		3	97.7	n.a.	
14		3	80.2	n.a.	
15		3	72.7	n.d. ^c	
16		18	100	n.a.	
17		18	91.6	n.d. ^c	

^a Integración del pico del producto en GC (área de GC no corregida).

^b Se ha observado erosión del producto ee en los medios de reacción; esta erosión no es catalizada enzimáticamente.

^c ee no ha sido determinado.

^o Estereo. se refiere a la estereoquímica asignada del producto.

La reducción de 3-metil-2-ciclopentenona (entradas 1, 2 y 3) y 3-metil-2-ciclohexenona (entradas 4, 5 y 6) resultó lenta y solo se obtuvo una conversión parcial en ambos casos. La enantioselectividad fue excelente para ambos sustratos.

5 La 2-metil-2-ciclopentenona, por otro lado, demostró ser muy activa y reaccionó rápidamente. Tenga en cuenta que el producto correspondiente, 2-metilciclopentanona, racemiza en las condiciones de reacción.

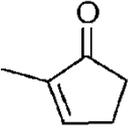
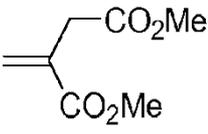
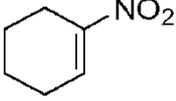
La Figura 1 muestra los cambios en el porcentaje de conversión con el cambio en el tiempo de reacción (h.) para cuatro de los sustratos enumerados en la Tabla 1.

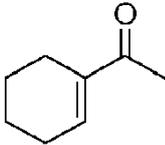
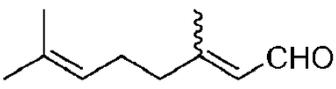
Estudio de concentración

5 Los sustratos que demostraron ser más activos con ENE-101 se probaron posteriormente a tres concentraciones diferentes: 50, 100 y 300 mM. Se siguió el procedimiento experimental 1 para estas pruebas. La cantidad de glucosa, ENE-101, GDH y NAD aumentó de acuerdo con la concentración del sustrato, por lo que el número de equivalentes permaneció constante. Como se describe en el procedimiento experimental anterior, se usó un regulador fosfato 250 mM pH 7.0 para las reacciones. No se hizo ningún intento de regular el pH a medida que tuvieron lugar las reacciones. Esto significa que, a altas concentraciones de sustrato, el ácido glucónico producido puede no estar completamente neutralizado, por lo que el pH de los medios es demasiado ácido para que funcione el ENE-101.

Los resultados se muestran en la Tabla 2.

10 Tabla 2-Tiempo de reacción, conversión y ee para sustratos con cambio en la concentración

Entrada	Substrato	Tiempo (h)	Cc (mM)	% Conv ^a	% ee
1		3	50	50.79	65.8 ^b
2		3	100	59.18	68.1 ^b
3		3	300	33.84	61.3 ^b
4		18	50	70.08	14.9 ^b
5		18	100	67.16	26.8 ^b
6		18	300	36.37	16.0 ^b
7		3	50	15.8	>99.9
8		3	100	14.9	>99.9
9		3	300	12.7	>99.9
10		18	100	46.3	>99.9
11		18	300	17.6	>99.9
12		3	50	60.3	n.a.
13		3	100	60.4	n.a.
14		3	300	43.1	n.a.
15		18	50	52.8	n.a.
16		18	100	68.5	n.a.
17		18	300	39.4	n.a.
18		3	50	6.5	n.a.
19	3	100	18.5	n.a.	

Entrada	Substrato	Tiempo (h)	Cc (mM)	% Conv ^a	% ee
20		3	300	24.1	n.a.
21		18	50	7.3	n.a.
22		18	100	49.9	n.a.
23		18	300	23	n.a.
24		3	50	60.8	n.d. ^c
25		3	100	76.6	n.d. ^c
26		3	300	43.6	n.d. ^c
27		18	50	92.4	n.d. ^c
28		18	100	81.2	n.d. ^c
29		18	300	52.3	n.d. ^c

^a Integración del pico del producto en GC (área de GC no corregida).

^b Se ha observado erosión del producto ee en los medios de reacción; esta erosión no es catalizada enzimáticamente.

^c ee no fue determinado.

La Figura 2 muestra los cambios en el porcentaje de conversión con el cambio en el tiempo de reacción (h.) y el cambio en la concentración de sustrato para tres de los sustratos enumerados en la Tabla 1.

5 Para la mayoría de los sustratos probados, se observa que la conversión no mejoró significativamente cuando el tiempo de reacción aumentó de 3 a 18 horas. Esto fue particularmente notable a altas concentraciones de sustrato e indica que el pH de los medios de reacción se volvió demasiado ácido para que la enzima funcione, haciendo que la conversión se detenga. Esto se comprobó midiendo el pH de los viales de reacción después de 3 y 18 horas.

10 En ninguno de los ejemplos probados hubo evidencia de inhibición del producto o sustrato incluso a concentraciones tan altas como 300 mM. Esto indica que debería ser posible realizar estas reducciones a concentraciones de hasta 300 mM (tal vez incluso más altas), e idealmente junto con el control del pH del medio de reacción.

Estudio de pH

En el estudio de pH, se eligió citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) como sustrato de prueba para estudios posteriores. Luego se estudió el efecto del pH del regulador y los resultados se muestran en la Figura 3.

15 Se supuso que el pH de la mezcla de reacción permanecía sustancialmente constante durante todo el procedimiento de reacción en vista del corto tiempo de reacción (típicamente alrededor de 1 minuto).

La reactividad se determinó mediante un ensayo fotométrico: la disminución de la absorbancia a 340 nm causada por la oxidación de NADH es una medida de la actividad catalítica de ENE-101. Concentraciones de ensayo: en 1 ml de mezcla de reacción, las concentraciones finales son fosfato de potasio 0.1 M pH 7.4, sustrato 10 mM, NADH 15 mM y 0.4 mg de ENE-101.

20 La actividad de fondo (disminución de la absorbancia de NADH en ausencia de sustrato) se midió para cada valor de pH. Se encontró que era más alto para pH 6 a 6.5 y para pH 8 a 9. ENE-101 se encontró estable y más activo entre pH 6.5 a 8.

Perfil de temperatura y estabilidad

También se estudió el perfil de temperatura de ENE-101 y se midió la actividad de fondo para cada temperatura y se resta de la actividad enzimática medida. Los resultados se muestran en la Figura 4.

La reactividad se determinó mediante un ensayo fotométrico como se describe anteriormente en relación con el estudio de pH. El sustrato fue citral.

- 5 La estabilidad de ENE-101 se estudió a tres temperaturas diferentes (30, 40 y 50°C). Como antes, se midió y eliminó la actividad de fondo. Los resultados de la actividad residual se muestran en la Figura 5. Nuevamente, la reactividad se determinó por ensayo fotométrico y el sustrato fue citral.

Los resultados en la Figura 5 indican que ENE-101 es razonablemente estable a temperaturas inferiores a 40°C, pero pierde rápidamente actividad a 50°C

- 10 Efecto de disolvente y aditivo

Los efectos de disolventes y aditivos se estudiaron usando el sustrato relativamente reactivo, 2-metil-2-ciclopentenona. Se compararon diferentes codisolventes al 5% en volumen siguiendo el Procedimiento Experimental 1. Los resultados de esta comparación en relación con el rendimiento y el ee del producto se muestran en la Figura 6.

- 15 Como se mencionó anteriormente, el producto de la reducción, 2-metilciclopentanona, racemiza en las condiciones de reacción. Entre los codisolventes probados, ninguno de ellos parece mejorar la conversión o prevenir la racemización en un grado significativo.

En condiciones idénticas, se evaluó el efecto de la adición de tensioactivo (a 0.1 y 0.3% en volumen) a la mezcla de reacción. Los resultados se muestran en la Figura 7.

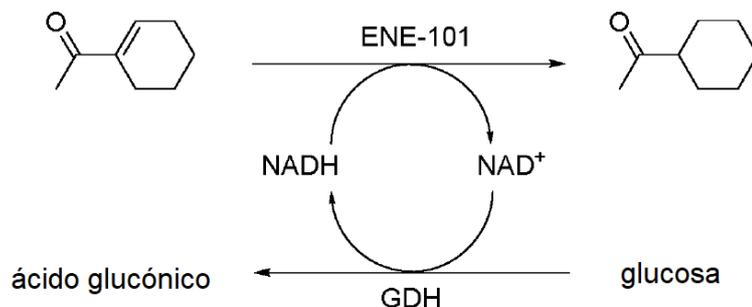
- 20 Entre los codisolventes probados en los volúmenes indicados, ninguno de ellos parece mejorar la conversión o evitar la racemización en un grado significativo.

Experimentos de escalamiento

Las reacciones de catálisis se realizaron posteriormente a una escala mayor para mostrar la utilidad del catalizador a un nivel industrialmente útil.

Una reacción de aumento de escala observó la reducción, como se muestra en el Esquema 1 a continuación.

Esquema 1



- 25

Procedimiento 1-Reactivos y método

	MW	Peso (g)	Mmol	Cc. (M)	Comentarios
D-glucosa · H ₂ O	198.17	8.2	41.4	0.826	10% de exceso
NaCl	58.44	1.68	28.7	0.575	
NAD ⁺	663.43	0.17	0.25	0.005	
1-Acetilciclohexano	124.18	4.67	37.6	0.752	Sustrato no completamente disuelto
ENE-101		1.0			21% en peso de sustrato

ES 2 762 703 T3

	MW	Peso (g)	Mmol	Cc. (M)	Comentarios
GDH		0.1			
KH ₂ PO ₄	136.09	0.03	0.2	0.004	
K ₂ HPO ₄	174.18	0.6	3.4	0.0685	
NaOH	40		37.6	0.752	

5 En un matraz de fondo redondo de 50 ml agitado magnéticamente (600 rpm, barra de agitación ovoide), con temperatura controlada (40°C) y equipado con una bomba dosificadora de pH controlado, se introdujo agua desionizada (36.3 ml), K₂HPO₄ (597 mg) y KH₂PO₄ (27 mg). Esto dio como resultado una solución reguladora de fosfato 0.1 M pH 8.0. Luego se añadió monohidrato de D-glucosa (8.2 g), haciendo que el pH de la solución cayera a 7.1. Después de estabilizar la temperatura, se añadió NaCl (1.68 g) seguido de ENE-101 (1.0 g), GDH (103 mg; 4,88 U/mg; 500 U), NAD (166 mg) y 1-acetilciclohexeno (4.67 g; 37.6 mmol).

La reacción se agitó a 40°C hasta que se observó conversión completa por análisis GC. Para mantener un pH constante de 7.0, la reacción fue dosificada con una solución de NaOH al 45%.

10 Para controlar las muestras de conversión (50 µL) se tomaron de la reacción a intervalos regulares. Se trataron con DCM (1.5 ml), se agitaron en vórtex, se centrifugaron para eliminar materiales insolubles y se analizaron por GC para medir la conversión. Después de 20 horas, se observó una conversión del 99.3% en producto por GC. El perfil de reacción se puede encontrar en las Figuras 8 y 9.

Procedimiento 2-Reactivos y método

	MW	Peso (g)	Mmol	Cc. (M)	Comentarios
D-glucosa·H ₂ O	198.17	15.4	77.7	1.554	
NaCl	58.44	1.68	28.7	0.575	
NAD ⁺	663.43	0.3	0.47	0.0095	
1-Acetilciclohexano	124.18	9.34	75.2	1.504	Sustrato no completamente disuelto
ENE-101		1.0			21% en peso de sustrato
GDH		0.1			
KH ₂ PO ₄	136.09	0.02	0.14	0.0028	
K ₂ HPO ₄	174.18	0.4	2.3	0.047	
NaOH	40		75.2	1.504	

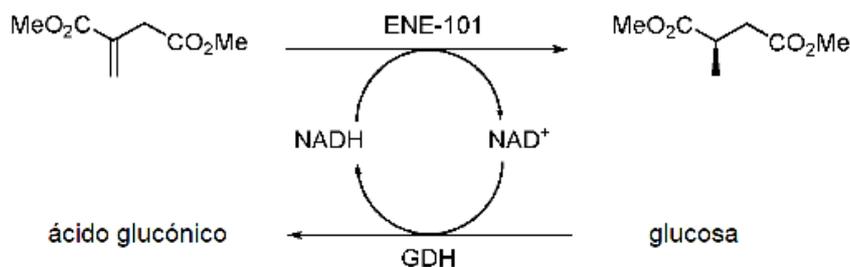
15 La reacción se repitió a doble concentración de sustrato siguiendo un procedimiento idéntico al descrito anteriormente. En esta ocasión, una solución de monohidrato de D-glucosa (15.4 g; 77.7 mmol), cloruro de sodio (1.68 g), NAD (316 mg; 0.47 mmol), GDH (103 mg; 4.88 U/mg; 500 U) y ENE-101 se colocó (1.0 g) en regulador fosfato 0.1 M pH 8.0 (24.8 ml) en un matraz de fondo redondo agitado magnéticamente a 40°C antes de ser tratado con 1-acetilciclohexeno (9.34 g; 75.2 mmol). La reacción se agitó a 40°C durante 96 horas. Para mantener un pH constante de 7.0, la reacción se dosificó con una solución de NaOH al 45%.

20

Se tomaron muestras (25 μL) de la reacción a intervalos regulares para controlar la conversión. Se trataron con DCM (1.5 ml), se agitaron en vórtex, se centrifugaron para eliminar materiales insolubles y se analizaron por GC para medir la conversión. Después de 26 horas, se observó una conversión del 75% en producto por GC (concentración de producto 1.125 M). La reacción se ralentizó y se detuvo al 95% de conversión. Un perfil de la reacción se puede encontrar en las Figuras 8 y 9.

Una reacción a escala adicional observó la reducción como se muestra en el Esquema 2 a continuación.

Esquema 2



Procedimiento 3-Reactivos y método

	MW	Peso (g)	Mmol	Cc. (M)	Comentarios
D-glucosa·H ₂ O	198.17	8.2	41.4	0.826	10% de exceso
NaCl	58.44	1.68	28.7	0.575	
NAD ⁺	663.43	0.17	0.25	0.005	
Dimetil Itaconato	158.15	5.9	37.3	0.731	Sustrato no completamente disuelto
ENE-101		1.0			21% en peso de sustrato
GDH		0.1			
KH ₂ PO ₄	136.09	0.03	0.2	0.004	
K ₂ HPO ₄	174.18	0.6	3.4	0.0685	
NaOH	40		37.6	0.752	

10 En un matraz de fondo redondo de 50 ml agitado magnéticamente (600 rpm, barra de agitación ovoide), se introdujo agua desionizada (36.8 ml) con temperatura controlada (40°C) y equipada con una bomba dosificadora de pH controlado (36.8 ml). K₂HPO₄ (597 mg) y KH₂PO₄ (27 mg). Esto dio como resultado una solución reguladora de fosfato 0.1 M pH 8.0. Luego se añadió monohidrato de D-glucosa (8.2 g), haciendo que el pH de la solución cayera a 7.1.

15 Después de estabilizar la temperatura, se añadió NaCl (1.68 g) seguido de ENE-101 (1.0 g), GDH (103 mg; 4,88 U/mg; 500 U), NAD (166 mg) y dimetil itaconato (5.9 g; 37.3 mmol). La reacción se agitó a 40°C hasta que se observó conversión completa por análisis GC. Para mantener un pH constante de 7.0, la reacción se dosificó con una solución de NaOH al 45%.

20 Para controlar las muestras de conversión (50 μL) se tomaron de la reacción a intervalos regulares. Se trataron con DCM (1.5 ml), se agitaron en vórtex, se centrifugaron para eliminar materiales insolubles y se analizaron por GC para medir la conversión. Después de 43 horas, se observó una conversión del 99% en producto (>99.9% ee, enantiómero R) por GC. El perfil de reacción se puede ver en las Figuras 10 y 11.

Datos experimentales adicionales

Catalizador

ENE-102 y ENE-103 se produjeron con una etiqueta (por ejemplo, con un N-terminal T7 y una etiqueta His) o sin etiqueta.

- 5 ENE-102 y ENE-103 se produjeron de forma similar a ENE-101 como se describió anteriormente. Las preparaciones ENE-102 y ENE-103 típicamente comprenden aproximadamente 1-2 U mg⁻¹ de preparación de catalizador usando NADPH como cofactor, como se describe generalmente mediante el ensayo descrito anteriormente, usando 1-octeno-3-ona como sustrato de referencia.

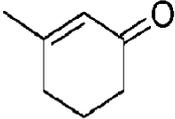
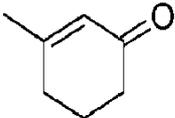
Estos datos experimentales adicionales incluyen datos ya presentados anteriormente, para facilitar la comparación.

- 10 Para definir el alcance del sustrato de las enzimas ENE-101, ENE-102 (referencia) y ENE-103 (referencia) se probaron frente a varios sustratos (enlaces C=C activados). Las reacciones se realizaron en condiciones idénticas (como se describe en el "Procedimiento experimental 2"); se tomaron muestras después de 3, 6 y 18 horas y se analizaron por GC para medir la conversión y el exceso enantiomérico. Los resultados de estas reacciones se describen en la Tabla 3.

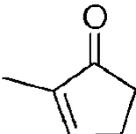
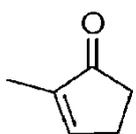
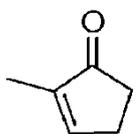
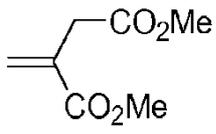
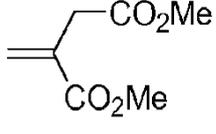
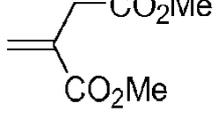
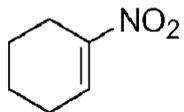
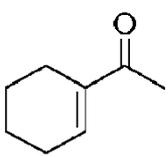
- 15 Procedimiento experimental 2: Se añadieron 50 µl de una solución de enzima liofilizada ENE-101, ENE-102 o ENE-103 en agua (100 mg/ml; 5 mg de enzima por prueba) a viales de reacción que contenían 900 µL de medios acuosos a pH 7 (regulador fosfato de potasio 250 mM pH 7, NAD⁺ 1,1 mM, D-glucosa 30 mM, 10 U/mL GDH) y 50 µL de solución de sustrato en tolueno (400 mM, concentración final de sustrato 20 mM). Los viales se agitaron a 35°C durante 3, 6 y 18 horas. Después de agregar 1 ml de EtOAc, los viales de reacción se agitaron en vórtex y se centrifugaron. Las muestras de la fase orgánica se analizaron por GC para medir la conversión y ee.

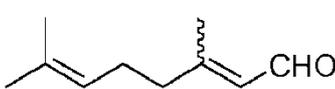
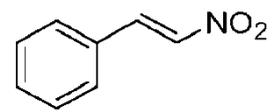
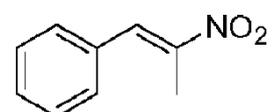
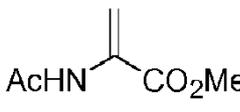
20

Tabla 3

Entrada	ENE-	Substrato	Tiempo (h)	% Conv ^a	% ee	Estereo.
1	101		3	2.7	>99.9	S
2	101		6	4.0	>99.9	S
3	101		18	10.2	>99.9	S
4 ^d	102		3	13.7	>99.9	S
5 ^d	102		6	16.4	>99.9	S
6 ^d	102		18	37.3	>99.9	S
7	101		3	4.0	>99.9	S
8	101		6	5.7	>99.9	S
9	101		18	18.7	>99.9	S
10 ^d	102		3	17.0	>99.9	S
11 ^d	102		6	25.8	>99.9	S
12 ^d	102		18	41.6	>99.9	S
13	101		3	91.4	51.4 ^b	
14	101		6	100	34.6 ^b	

ES 2 762 703 T3

Entrada	ENE-	Substrato	Tiempo (h)	% Conv ^a	% ee	Estereo.
						
15 ^d	102		3	100	49.2 ^b	
16 ^d	103		3	94.8	71.1 ^b	
17 ^d	103		6	100	75.4 ^b	
18	101		3	27.6	>99.9	<i>R</i>
19	101		6	42.2	>99.9	<i>R</i>
20	101		18	91.1	>99.9	<i>R</i>
21 ^d	102		3	100	>99.9	<i>R</i>
22 ^d	103		3	60	>99.9	<i>R</i>
23 ^d	103		6	76.3	>99.9	<i>R</i>
24 ^d	103		18	85.2	>99.9	<i>R</i>
25	101		18	97.7	n.a.	
26 ^d	102		18	100	n.a.	
27 ^d	103		18	100	n.a.	
28	101		18	80.2	n.a.	
29 ^d	102		18	97.6	n.a.	
30 ^d	103		18	100	n.a.	

Entrada	ENE-	Substrato	Tiempo (h)	% Conv ^a	% ee	Estereo.
31	101		18	72.7	n.d. ^c	
32 ^d	102		18	88.8	n.d. ^c	
33 ^d	103		18	35.9	n.d. ^c	
34	101		18	100	n.a.	
35 ^d	102		18	100	n.a.	
36 ^d	103		18	97.4	n.a.	
37	101		18	91.6	n.d. ^c	
38 ^d	102		18	80.5	n.d. ^c	
39 ^d	103		18	80.9	n.d. ^c	
40	101		18	33.0	n.d. ^c	
41 ^d	102		18	97.7	n.d. ^c	
42 ^d	103		18	40.1	n.d. ^c	

^a Integración del pico del producto en GC (área de GC no corregida).

^b Se ha observado erosión del producto ee en los medios de reacción; esta erosión no es catalizada enzimáticamente.

^c ee no ha sido determinado;

^d referencia

La reducción tanto de 3-metil-2-ciclopentenona como de 3-metil-2-ciclohexenona resultó lenta y solo se obtuvo una conversión parcial tanto con ENE-101 como con ENE-102. Sin embargo, la enantioselectividad fue excelente para ambos sustratos. ENE-103 aparentemente estaba inactivo contra estos sustratos (datos no mostrados). Esto parecía ser un caso aislado de inactividad, ya que se observó que ENE-103 tenía actividad para formas estructuralmente relacionadas, tales como 2-metil-2-ciclopentenona y 1- (ciclohexen-1-il)etanona (entradas 16 y 17 en Tabla 3).

La 2-metil-2-ciclopentenona se redujo rápidamente por las tres enzimas. Desafortunadamente, el producto correspondiente, 2-metilciclopentanona, racemizado bajo las condiciones de reacción.

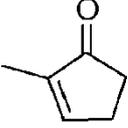
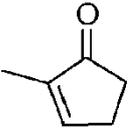
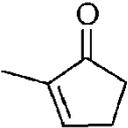
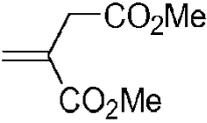
Se ha informado que las enzimas amarillas antiguas reducen más fácilmente las enonas sustituidas con α que las sustituidas con β . Como ejemplos, véanse los informes sobre reducciones con *Shewanella* OYE (SYE-4) (Iqbal et al, 2012), enoato reductasa de *Zymomonas mobilis* y OYEs de *Kluyveromyces lactis* (KYE1) y de *Yersinia bercovieri* (Yers-ER) (Yanto et al, 2011; Hall et al, 2008).

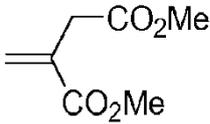
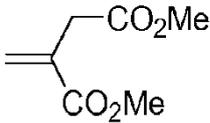
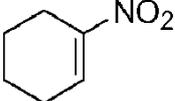
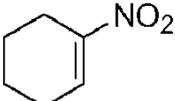
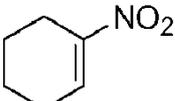
La Figura 12 muestra los datos presentados en la Tabla 3.

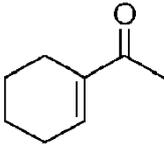
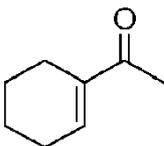
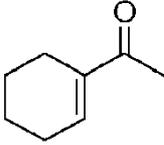
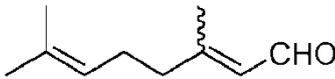
Esos sustratos que resultaron más fáciles de reducir se probaron posteriormente a tres concentraciones diferentes: 50, 100 y 300 mM. Se siguió el procedimiento experimental 2 para estas pruebas. La cantidad de glucosa, ENE, GDH y NAD se incrementaron de acuerdo con la concentración del sustrato, por lo que el número de equivalentes permaneció constante. Como se describe en el procedimiento experimental, se usó un regulador fosfato 250 mM pH 7.0 para las reacciones. No se hicieron intentos para regular el pH a medida que tuvieron lugar las reacciones. Esto significa que, a altas concentraciones de sustrato, el ácido glucónico producido puede no estar completamente neutralizado, lo que hace que el pH de los medios sea demasiado ácido para que los ENE funcionen.

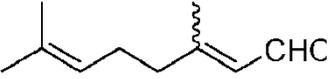
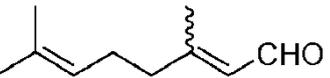
Los resultados de estas pruebas se pueden encontrar en la Tabla 4 y las Figuras 13A y 13B.

Tabla 4

Entrada	ENE-	Substrato	Tiempo (h)	Cc (mM)	% Conv ^a	% ee
1	101		3	50	50.8	65.8 ^b
2			3	100	59.2	68.1 ^b
3			3	300	33.8	61.3 ^b
4			18	50	70.1	14.9 ^b
5			18	100	67.2	26.8 ^b
6			18	300	36.4	16.0 ^b
7	102 ^d		3	50	38.5	66.7 ^b
8			3	100	30.0	65.3 ^b
9			3	300	6.8	57.5 ^b
10			18	50	68.8	38.1 ^b
11			18	100	44.1	31.8 ^b
12			18	300	43.9	31.8 ^b
13	103 ^d		3	50	26.4	80.3 ^b
14			3	100	38.4	80.7 ^b
15			3	300	38.2	79.1 ^b
16			18	50	74.5	55.2 ^b
17			18	100	87.3	48.7 ^b
18			18	300	51.5	67.8 ^b
19	101		3	50	15.8	>99.9
20			3	100	14.9	>99.9
21			3	300	12.7	>99.9
22			18	100	46.3	>99.9
23			18	300	17.6	>99.9

Entrada	ENE-	Substrato	Tiempo (h)	Cc (mM)	% Conv ^a	% ee
24	102 ^d		3	50	89.3	>99.9
25			3	100	100	>99.9
26			3	300	43.4	>99.9
27			18	300	37.3	>99.9
28	103 ^d		3	50	24.1	>99.9
29			3	100	47.5	>99.9
30			3	300	44.4	>99.9
31			18	100	69.7	>99.9
32			18	300	47.1	>99.9
33	101		3	50	60.3	n.a.
34			3	100	60.4	n.a.
35			3	300	43.1	n.a.
36			18	50	52.8	n.a.
37			18	100	68.5	n.a.
38			18	300	39.4	n.a.
39	102 ^d		3	50	67.3	n.a.
40			3	100	65.4	n.a.
41			3	300	39	n.a.
42			18	50	61.9	n.a.
43			18	100	49.8	n.a.
44			18	300	39.5	n.a.
45	103 ^d		3	50	92	n.a.
46			3	100	59.4	n.a.
47			3	300	34.5	n.a.
48			18	50	96.8	n.a.

Entrada	ENE-	Substrato	Tiempo (h)	Cc (mM)	% Conv ^a	% ee
49			18	100	83.1	n.a.
50			18	300	47	n.a.
51	101		3	50	6.5	n.a.
52			3	100	18.5	n.a.
53			3	300	24.1	n.a.
54			18	50	7.3	n.a.
55			18	100	49.9	n.a.
56			18	300	23.0	n.a.
57			102 ^d		3	50
58	3	100			5.5	n.a.
59	3	300			14.1	n.a.
60	18	50			3.4	n.a.
61	18	100			5.9	n.a.
62	18	300			11.3	n.a.
63	103 ^d		3	50	44.0	n.a.
64			3	100	46.0	n.a.
65			3	300	41.9	n.a.
66			18	50	94.9	n.a.
67			18	100	95.0	n.a.
68			18	300	56.2	n.a.
69	101		3	50	60.8	n.d. ^c
70			3	100	76.6	n.d. ^c
71			3	300	43.6	n.d. ^c
72			18	50	92.4	n.d. ^c
73			18	100	81.2	n.d. ^c

Entrada	ENE-	Substrato	Tiempo (h)	Cc (mM)	% Conv ^a	% ee
74			18	300	52.3	n.d. ^c
75	102 ^d		3	50	80.3	n.d. ^c
76			3	100	67.6	n.d. ^c
77			3	300	40.2	n.d. ^c
78			18	50	85.9	n.d. ^c
79			18	100	75.0	n.d. ^c
80			18	300	46.8	n.d. ^c
81	103 ^d		3	50	5.3	n.d. ^c
82			3	100	6.8	n.d. ^c
83			3	300	6.5	n.d. ^c
84			18	50	14.2	n.d. ^c
85			18	100	21.6	n.d. ^c
86			18	300	21.8	n.d. ^c

^a Integración del pico del producto en GC (área de GC no corregida).

^b Se ha observado erosión del producto ee en los medios de reacción; esta erosión no es catalizada enzimáticamente.

^c ee no ha sido determinado;

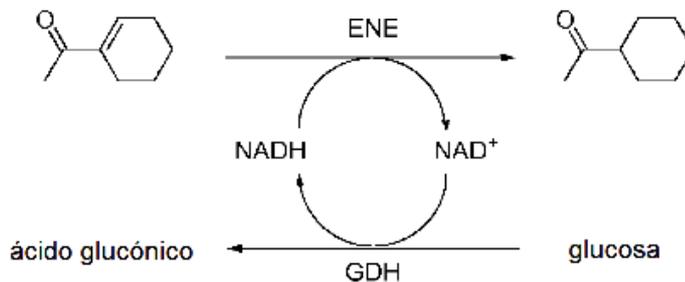
^d referencia.

5 Para la mayoría de los sustratos probados, la conversión no mejoró significativamente al pasar de 3 a 18 horas de tiempo de reacción. Esto fue particularmente notable a altas concentraciones de sustrato e indica que el pH de los medios de reacción se volvió demasiado ácido para que la enzima funcione, haciendo que la conversión se detenga. Esto se comprobó midiendo el pH de los viales de reacción después de 3 y 18 horas.

No se encontró evidencia de inhibición del producto o sustrato en ninguno de los experimentos, incluso a concentraciones tan altas como 300 mM. Esto muestra que es posible realizar estas reducciones a concentraciones de hasta 300 mM, o superiores a 300 mM. La regulación del pH de los medios de reacción puede mejorar aún más las reacciones que usan altas concentraciones de sustrato.

10 Experimentos a escala

Reducción de 1-acetilciclohexeno



Esquema 3. Esquema de reacción

Procedimiento a.1 (0.75 M)

	MW	Peso (g)	Mmol	Cc. (M)	Comentarios
D-glucosa · H ₂ O	198.17	8.2	41.4	0.826	10% de exceso
NaCl	58.44	1.68	28.7	0.575	
NAD ⁺	663.43	0.17	0.25	0.005	
1-Acetilciclohexano	124.18	4.67	37.6	0.752	Sustrato no completamente disuelto
ENE		1.0			21% en peso de sustrato
GDH		0.1			
KH ₂ PO ₄	136.09	0.03	0.2	0.004	
K ₂ HPO ₄	174.18	0.6	3.4	0.0685	
NaOH	40		37.6	0.752	

- 5 En un matraz de fondo redondo de 50 ml agitado magnéticamente (600 rpm, barra de agitación ovoide), con temperatura controlada (40°C) y equipado con una bomba dosificadora de pH controlado, se introdujo agua desionizada (36.3 ml) (36.3 ml), K₂HPO₄ (597 mg) y KH₂PO₄ (27 mg). Esto dio como resultado una solución reguladora de fosfato 0.1 M pH 8.0. Luego se añadió monohidrato de D-glucosa (8.2 g), haciendo que el pH de la solución cayera a 7.1. Después de estabilizar la temperatura, se añadió NaCl (1.68 g) seguido de ENE (-101, -102 (referencia) o -103 (referencia), 1.0 g), GDH (103 mg; 4.88 U/mg; 500 U), NAD (166 mg) y 1-acetilciclohexeno (4.67 g; 37.6 mmol).
- 10 La reacción se agitó a 40°C hasta que se observó conversión completa por análisis de GC. Para mantener un pH constante de 7.0, la reacción se dosificó con una solución de NaOH al 45%.

En cuanto a la conversión incompleta de ENE-102 se obtuvo a 750 mM, incluso después de tiempos prolongados, la reacción se repitió a 300 mM, dando como resultado una conversión completa durante la noche. Para ENE-101, la reacción se repitió a doble concentración, 1500 mM.

15

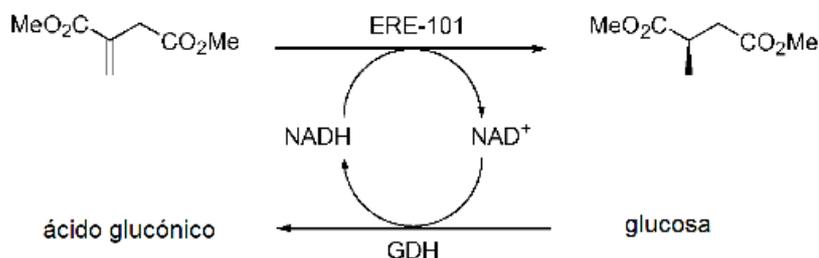
Procedimiento a.2 (1.5 M)

	MW	Peso (g)	Mmol	Cc. (M)	Comentarios
D-glucosa·H ₂ O	198.17	15.4	77.7	1.554	
NaCl	58.44	1.68	28.7	0.575	
NAD ⁺	663.43	0.3	0.47	0.0095	
1-Acetilciclohexano	124.18	9.34	75.2	1.504	Sustrato no completamente disuelto
ENE-101		1.0			21% en peso de sustrato
GDH		0.1			
KH ₂ PO ₄	136.09	0.02	0.14	0.0028	
K ₂ HPO ₄	174.18	0.4	2.3	0.047	
NaOH	40		75.2	1.504	

La reacción se repitió a doble concentración de sustrato siguiendo un procedimiento idéntico al descrito anteriormente. En esta ocasión, una solución de monohidrato de D-glucosa (15.4 g; 77.7 mmol), cloruro de sodio (1.68 g), NAD (316 mg; 0.47 mmol), GDH (103 mg; 4.88 U/mg; 500 U) y ENE-101 se colocó (1.0 g) en regulador fosfato 0.1 M pH 8.0 (24.8 ml) en un matraz de fondo redondo agitado magnéticamente a 40°C antes de ser tratado con 1-acetilciclohexeno (9.34 g; 75.2 mmol). La reacción se agitó a 40°C durante 96 horas. Para mantener un pH constante de 7.0, la reacción se dosificó con una solución de NaOH al 45%.

Para controlar las muestras de conversión (50 µL) se tomaron de las diferentes reacciones a intervalos regulares. Se trataron con DCM (1.5 ml), se agitaron en vórtex, se centrifugaron para eliminar materiales insolubles y se analizaron por GC para medir la conversión. Los perfiles de las diferentes reacciones se pueden ver en las Figuras 14 y 15.

Reducción de dimetil itaconato



Esquema 4. Esquema de reacción

Procedimiento b.1 (.073 M)

	MW	Peso (g)	Mmol	Cc. (M)	Comentarios
D-glucosa·H ₂ O	198.17	8.2	41.4	0.826	10% de exceso

	MW	Peso (g)	Mmol	Cc. (M)	Comentarios
NaCl	58.44	1.68	28.7	0.575	
NAD ⁺	663.43	0.17	0.25	0.005	
Dimetil Itaconato	158.15	5.9	37.3	0.731	Sustrato no completamente disuelto
ENE		1.0			21% en peso de sustrato
GDH		0.1			
KH ₂ PO ₄	136.09	0.03	0.2	0.004	
K ₂ HPO ₄	174.18	0.6	3.4	0.0685	
NaOH	40		37.6	0.752	

5 En un matraz de fondo redondo de 50 ml agitado magnéticamente (600 rpm, barra de agitación ovoide), con temperatura controlada (40°C) y equipado con una bomba dosificadora de pH controlado, se introdujo agua desionizada (36.8 ml), K₂HPO₄ (597 mg) y KH₂PO₄ (27 mg). Esto dio como resultado una solución reguladora de fosfato 0.1 M pH 8.0. Luego se añadió monohidrato de D-glucosa (8.2 g), haciendo que el pH de la solución cayera a 7.1. Después de estabilizar la temperatura, se añadió NaCl (1.68 g) seguido de ENE (-101, -102 (referencia) o -103 (referencia), 1,0 g), GDH (103 mg; 4.88 U/mg; 500 U), NAD (166 mg) y dimetil itaconato (5.9 g; 37.3 mmol). La reacción se agitó a 40°C hasta que se observó la conversión completa por análisis GC. Para mantener un pH constante de 7.0, la reacción se dosificó con una solución de NaOH al 45%.

10 Para monitorizar la conversión se tomaron muestras (50 µL) de la reacción a intervalos regulares.

Se trataron con DCM (1.5 ml), se agitaron en vórtex, se centrifugaron para eliminar materiales insolubles y se analizaron por GC para medir la conversión. Por GC se observó más del 95% de conversión en producto (>99.9% ee, enantiómero R) para las tres enzimas. El perfil de reacción se puede ver en las Figuras 16 y 17.

Referencias

15 Se citan anteriormente varias publicaciones para describir y divulgar más completamente la invención y el estado de la técnica a la que pertenece la invención. A continuación se proporcionan citas completas para estas referencias.

Para la biología molecular estándar y las técnicas de expresión y aislamiento de proteínas, véase:

Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

20 Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 405-410

Brenna et al. (2012) *Chem Cat Chem.* 4: 653-659

Hall et al. (2008) *Eur. J. Org. Chem.* 1511

Hirata et al. (2009) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 59: 158-162.

Iqbal et al. (2012) *Tetrahedron.* 68: 7619-7623

25 Lalonde and Margolin (2002) "Immobilization of Enzymes" in Drauz K. and Waidmann H., *Enzyme catalysis in Organic Synthesis*, Vo. III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim.

Lucas S et al. Complete sequence of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ATCC 19860.

Submitted (FEB-2011) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Strain: ATCC 19860/DSM 7227/JCM 20985/NCPPB 1011.

30 US 2010/0035315

Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)

Mangan et al. (2012) Adv Synth Catal. 354: 2185-2190

Mansell et al. (2013) Catalysis. 3: 370-379

Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448

5 Peitruszka J. and Scholzel M., (2012) Adv. Synth. Catal., 354: 751-756

Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197

Winkler et al. (2013) The Journal of Organic Chemistry. 78: 1525-1533

Yanto et al. (2011), Org. Lett. 13: 2540

Listado de secuencias

10

<110> Johnson Matthey PLC

<120> Catalizador y uso del mismo

<130> 70241/NJW

<150> GB 1413899.4

15 <151> 2014-08-06

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 376

20 <212> PRT

<213> Acidovorax avenae

<400> 1

ES 2 762 703 T3

Met Ser His Thr Leu Phe Asp Pro Val Gln Ala Gly Asp Leu Gln Leu
1 5 10 15

Ala Asn Arg Ile Ala Met Ala Pro Leu Thr Arg Asn Arg Ser Pro Asn
20 25 30

Ala Val Pro Lys Asp Ile Thr Ala Thr Tyr Tyr Ala Gln Arg Ala Thr
35 40 45

Ala Gly Leu Leu Ile Thr Glu Ala Thr Ala Ile Ser His Gln Gly Gln
50 55 60

Gly Tyr Ala Asp Val Pro Gly Leu Tyr Ser Thr Glu Gln Leu Asp Gly
65 70 75 80

Trp Lys Lys Val Thr Ala Ala Val His Glu Arg Gly Gly Arg Ile Val
85 90 95

Thr Gln Leu Trp His Val Gly Arg Ile Ser His Asn Asp Leu Gln Pro
100 105 110

Asp Gly Gly Ala Pro Val Ala Pro Ser Ala Ile Ala Ala Lys Ser Lys
115 120 125

Thr Tyr Leu Ile Asp Lys Ala Thr Gly Gln Gly His Phe Ala Ala Thr
130 135 140

Ser Glu Pro Arg Ala Leu Asp Ala Glu Glu Leu Pro Gly Ile Val His
145 150 155 160

Asp Tyr Ala Ala Ala Ala Arg Asn Ala Val Glu Thr Ala Gly Phe Asp

ES 2 762 703 T3

<212> ADN

<213> Acidovorax avenae

<400> 2

ttgtcccata	cgcttttcga	tcccgtccag	gccggcgacc	tgcagctcgc	caaccgcatc	60
gccatggcgc	cgctcacgcg	caaccgctcg	ccgaatgcgg	tgcccaagga	cattaccgcc	120
acctactacg	cccagcgcgc	caccgcgggc	ctgctgatca	ccgaggccac	ggccatcagc	180
caccagggcc	agggctatgc	ggacgtgccg	ggcctgtaca	gcaccgaaca	gctcgatgga	240
tggaaaaagg	tcaccgcagc	ggtccatgag	cgcggcggca	ggatcgtgac	ccagctctgg	300
caagtgggcc	gcatttccca	caatgacctg	cagcccgcgc	gcggcgcccc	cgtggccccc	360
tccgccatcg	ccgccaaagt	caagacctac	ctgatcgaca	aggccaccgg	ccagggccat	420
ttcggggcca	cgccgaacc	ccgtgcgctg	gatgccgaag	agctgcccgg	catcgtgcac	480
gactacgccg	ccgccgcgcg	caacgcggtg	gagacggccg	gattcgacgg	cgtcgagatc	540
cacggcgcca	acggctacct	gctggaccag	ttcctcaaga	ccggcgccaa	ccggcgcacc	600
gacgactacg	gcggcagcat	cgagaaccgc	gcgcgcctgc	tgctcgaagc	cacgcgcgcc	660
gtggtggacg	cgatcggcgg	cggcaaggtg	ggcatccgac	tctcgcccgt	cacgccggcc	720
aacgacatcg	tcgatgccga	tccgcagccg	ctgttcgact	acgtgatccg	ccagctcgca	780
ccgctgggcc	tggcctacgt	gcacgtgatc	gaaggctcca	ccggcggccc	gcgcgagctg	840
gaagaccgtc	cgttcgacta	cgaagccctg	aagaccgcct	accgcgaggc	cggcggcaaa	900
ggcgccctgga	tggtaacaaa	cgcctatgac	cgtgcgttgg	cgatggaagc	ggtggccagt	960
ggccgcgcgc	acatcgtcgc	cttcggcaag	gccttcatct	ccaacccccga	cctggtcgag	1020
cggctgcgcc	aggacgcacc	gctcaacccc	tgggactcca	agaccttcta	cggcggcggc	1080
5 gagaagggct	acaccgacta	cccgcgcctc	ggcgaatcgg	cgaaggctg	a	1131

<210> 3

<211> 1134

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia de ácidos nucleicos, catalizador codificador optimizado por codones, (que codifica la SEQ ID NO: 1)

<400> 3

ES 2 762 703 T3

atgagccata ccctgtttga tccggttcag gcaggcgatc tgcagctggc aaatcgtatt 60
gcaatggcac cgctgacccg taatcgtagc ccgaatgcag ttccgaaaga tattaccgca 120
acctattatg cacagcgtgc aaccgcaggt ctgctgatta ccgaagcaac cgcaattagc 180
catcagggtc agggttatgc agatgttccg ggtctgtata gcaccgaaca gctggatggg 240
tggaaaaaag ttaccgcagc agtgcataaa cgtgggtggc gtattgttac ccagctgtgg 300
catgtgggtc gtattagcca taatgatctg caaccggatg gtggtgctcc ggtggcaccg 360
agcgcaattg cagcaaaaag caaacctat ctgattgata aagcaaccgg tcagggcat 420
tttgacgcaa ccagcgaacc gcgtgcactg gatgcagaag aactgcctgg tattgttcat 480
gattatgcag cagcagcacg taatgcagtt gaaaccgcag gctttgatgg tgttgaaatt 540
catgggtgcaa atggctatct gctggatcag tttctgaaaa ccggtgcaaa tcgtcgtacc 600
gatgattatg gtggtagcat tgaataatcgt gcccgctctgc tgctggaagc aaccctgca 660
gttgttgatg caattgggtg tggtaaagtt ggtattcgtc tgagtccggt tacaccggca 720
aatgatattg tggatgccga tccgcagccg ctgtttgatt atgttattcg tcagctggct 780
ccgctgggtc tggcctatgt tcatgttatt gaaggtagca ccggtggtcc tcgtgaactg 840
gaagatcgtc cgttcgatta tgaagcactg aaaacagcat atcgtgaagc aggcggtaaa 900
ggtgcatgga tggtaataa tgcctatgat cgtgccctgg caatggaagc agttgcaagc 960
ggtcgtgcag atattgttgc atttggtaaa gcctttatta gcaatccgga tctggttgaa 1020
cgtctgcgtc aggatgctcc gctgaatccg tgggatagta aaaccttta tgggtggcggg 1080
gaaaaaggct ataccgatta tccgaccctg ggtgaaagcg caaaaggta ataa 1134

<210> 4

<211> 392

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del catalizador, incluida la etiqueta T7

<400> 4

ES 2 762 703 T3

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Glu Phe
 1 5 10 15

Met Ser His Thr Leu Phe Asp Pro Val Gln Ala Gly Asp Leu Gln Leu
 20 25 30

Ala Asn Arg Ile Ala Met Ala Pro Leu Thr Arg Asn Arg Ser Pro Asn
 35 40 45

Ala Val Pro Lys Asp Ile Thr Ala Thr Tyr Tyr Ala Gln Arg Ala Thr
 50 55 60

Ala Gly Leu Leu Ile Thr Glu Ala Thr Ala Ile Ser His Gln Gly Gln
 65 70 75 80

Gly Tyr Ala Asp Val Pro Gly Leu Tyr Ser Thr Glu Gln Leu Asp Gly
 85 90 95

Trp Lys Lys Val Thr Ala Ala Val His Glu Arg Gly Gly Arg Ile Val
 100 105 110

Thr Gln Leu Trp His Val Gly Arg Ile Ser His Asn Asp Leu Gln Pro

ES 2 762 703 T3

	115		120		125										
Asp	Gly	Gly	Ala	Pro	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Ile	Ala	Ala	Lys	Ser	Lys
	130					135					140				
Thr	Tyr	Leu	Ile	Asp	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	His	Phe	Ala	Ala	Thr
145					150					155					160
Ser	Glu	Pro	Arg	Ala	Leu	Asp	Ala	Glu	Glu	Leu	Pro	Gly	Ile	Val	His
				165					170					175	
Asp	Tyr	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Asn	Ala	Val	Glu	Thr	Ala	Gly	Phe	Asp
			180					185					190		
Gly	Val	Glu	Ile	His	Gly	Ala	Asn	Gly	Tyr	Leu	Leu	Asp	Gln	Phe	Leu
		195					200					205			
Lys	Thr	Gly	Ala	Asn	Arg	Arg	Thr	Asp	Asp	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ile	Glu
	210					215					220				
Asn	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Thr	Arg	Ala	Val	Val	Asp	Ala
225					230					235					240
Ile	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Gly	Ile	Arg	Leu	Ser	Pro	Val	Thr	Pro	Ala
				245					250					255	
Asn	Asp	Ile	Val	Asp	Ala	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Phe	Asp	Tyr	Val	Ile
			260					265					270		
Arg	Gln	Leu	Ala	Pro	Leu	Gly	Leu	Ala	Tyr	Val	His	Val	Ile	Glu	Gly
		275					280					285			
Ser	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Glu	Leu	Glu	Asp	Arg	Pro	Phe	Asp	Tyr	Glu
	290					295					300				
Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	Tyr	Arg	Glu	Ala	Gly	Gly	Lys	Gly	Ala	Trp	Met
305					310					315					320
Val	Asn	Asn	Ala	Tyr	Asp	Arg	Ala	Leu	Ala	Met	Glu	Ala	Val	Ala	Ser
				325					330					335	
Gly	Arg	Ala	Asp	Ile	Val	Ala	Phe	Gly	Lys	Ala	Phe	Ile	Ser	Asn	Pro
			340					345					350		
Asp	Leu	Val	Glu	Arg	Leu	Arg	Gln	Asp	Ala	Pro	Leu	Asn	Pro	Trp	Asp
		355					360					365			

ES 2 762 703 T3

Ser Lys Thr Phe Tyr Gly Gly Gly Glu Lys Gly Tyr Thr Asp Tyr Pro
370 375 380

Thr Leu Gly Glu Ser Ala Lys Gly
385 390

<210> 5

<211> 412

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del catalizador, incluida la etiqueta His y la etiqueta T7

<400> 5

ES 2 762 703 T3

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
20 25 30

Gly Ser Glu Phe Met Ser His Thr Leu Phe Asp Pro Val Gln Ala Gly
35 40 45

Asp Leu Gln Leu Ala Asn Arg Ile Ala Met Ala Pro Leu Thr Arg Asn
50 55 60

Arg Ser Pro Asn Ala Val Pro Lys Asp Ile Thr Ala Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Gln Arg Ala Thr Ala Gly Leu Leu Ile Thr Glu Ala Thr Ala Ile Ser
85 90 95

His Gln Gly Gln Gly Tyr Ala Asp Val Pro Gly Leu Tyr Ser Thr Glu
100 105 110

Gln Leu Asp Gly Trp Lys Lys Val Thr Ala Ala Val His Glu Arg Gly
115 120 125

Gly Arg Ile Val Thr Gln Leu Trp His Val Gly Arg Ile Ser His Asn
130 135 140

Asp Leu Gln Pro Asp Gly Gly Ala Pro Val Ala Pro Ser Ala Ile Ala
145 150 155 160

Ala Lys Ser Lys Thr Tyr Leu Ile Asp Lys Ala Thr Gly Gln Gly His
165 170 175

ES 2 762 703 T3

Phe Ala Ala Thr Ser Glu Pro Arg Ala Leu Asp Ala Glu Glu Leu Pro
 180 185 190

Gly Ile Val His Asp Tyr Ala Ala Ala Ala Arg Asn Ala Val Glu Thr
 195 200 205

Ala Gly Phe Asp Gly Val Glu Ile His Gly Ala Asn Gly Tyr Leu Leu
 210 215 220

Asp Gln Phe Leu Lys Thr Gly Ala Asn Arg Arg Thr Asp Asp Tyr Gly
 225 230 235 240

Gly Ser Ile Glu Asn Arg Ala Arg Leu Leu Leu Glu Ala Thr Arg Ala
 245 250 255

Val Val Asp Ala Ile Gly Gly Gly Lys Val Gly Ile Arg Leu Ser Pro
 260 265 270

Val Thr Pro Ala Asn Asp Ile Val Asp Ala Asp Pro Gln Pro Leu Phe
 275 280 285

Asp Tyr Val Ile Arg Gln Leu Ala Pro Leu Gly Leu Ala Tyr Val His
 290 295 300

Val Ile Glu Gly Ser Thr Gly Gly Pro Arg Glu Leu Glu Asp Arg Pro
 305 310 315 320

Phe Asp Tyr Glu Ala Leu Lys Thr Ala Tyr Arg Glu Ala Gly Gly Lys
 325 330 335

Gly Ala Trp Met Val Asn Asn Ala Tyr Asp Arg Ala Leu Ala Met Glu
 340 345 350

Ala Val Ala Ser Gly Arg Ala Asp Ile Val Ala Phe Gly Lys Ala Phe
 355 360 365

Ile Ser Asn Pro Asp Leu Val Glu Arg Leu Arg Gln Asp Ala Pro Leu
 370 375 380

Asn Pro Trp Asp Ser Lys Thr Phe Tyr Gly Gly Gly Glu Lys Gly Tyr
 385 390 395 400

Thr Asp Tyr Pro Thr Leu Gly Glu Ser Ala Lys Gly
 405 410

ES 2 762 703 T3

<210> 6

<211> 1239

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Secuencia sintética: Catalizador que codifica la secuencia de ácidos nucleicos que incluye la etiqueta His y la etiqueta T7 (que codifica la SEQ ID NO: 5)

<400> 6

```

atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat      60
atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtcgcggat ccgaattcat gtcccatacg      120
cttttcgatc ccgtccaggc cggcgacctg cagctcgcca accgcatcgc catggcgccg      180
ctcaocgcga accgctcgcc gaatgcggtg cccaaggaca ttaccgccac ctactacgcc      240
cagcgcgcca ccgccggcct gctgatcacc gaggccacgy ccatcagcca ccagggccag      300
ggctatgcgg acgtgccggg cctgtacagc accgaacagc tcgatggatg gaaaaaggtc      360
accgcagcgg tccatgagcg cggcggcagg atcgtgacct agctctggca cgtgggcccgc      420
atttcccaca atgacctgca gcccgacggc ggcgcccccg tggccccctc cgccatcgcc      480
gccaagtcca agacctacct gatcgacaag gccaccggcc agggccattt cgcggccaocg      540
tccgaacccc gtgcgctgga tgccgaagag ctgcccggca tcgtgcacga ctacgccgcc      600
gccgcgcgca acgcggtgga gacggccgga ttcgacggcg tcgagatcca cggcgccaac      660
ggctacctgc tggaccagtt cctcaagacc ggcgccaacc ggcgcaccga cgactacggc      720
ggcagcatcg agaaccgcgc gcgcctgctg ctcgaagcca cgcgcgccgt ggtggacgcg      780
atcggcggcg gcaagggtgg catccgactc tcgcccgtca cgcggccaa cgacatcgtc      840
gatgccgatc cgcagccgct gttcgactac gtgatccgcc agctcgcacc gctgggacctg      900
gcctacgtgc acgtgatcga aggctccacc ggcggcccgc gcgagctgga agaccgtccg      960
ttcgactacg aagccctgaa gaccgcctac cgcgaggccg gcggcaaagg cgcctggatg     1020
gtcaacaacg cctatgaccg tgcgttggcg atggaagcgg tggccagtgg ccgcgccgac     1080
atcgtcgcct tcggcaaggc cttcatctcc aaccccgacc tggtcgagcg gctgcgccag     1140
gacgcaccgc tcaacccttg ggactccaag accttctacg gcggcggcga gaagggctac     1200
accgactacc cgacgctcgg cgaatcggcg aaaggctga                               1239

```

10 <210> 7

<211> 364

<212> PRT

<213> Chromobacterium violaceum

<400> 7

ES 2 762 703 T3

Met Asn Ala Asp Lys Leu Leu Thr Pro Leu Thr Met Gly Ala Val Ala
1 5 10 15

Leu Ser Asn Arg Val Val Met Ala Pro Leu Thr Arg Leu Arg Asn Ile
20 25 30

ES 2 762 703 T3

Glu Pro Gly Asp Val Pro Gly Pro Leu Ala Lys Glu Tyr Tyr Arg Gln
 35 40 45

Arg Ala Ser Ala Gly Leu Ile Val Ala Glu Gly Thr His Ile Ser Pro
 50 55 60

Thr Ala Lys Gly Tyr Ala Gly Ala Pro Gly Ile Tyr Ser Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Val Arg Ala Trp Ser Glu Val Thr Gly Ala Val His Gln Asp Gly Gly
 85 90 95

Lys Ile Ala Leu Gln Leu Trp His Thr Gly Arg Ile Ser His Arg Ser
 100 105 110

Leu Gln Pro Asn Gly Asp Ala Pro Val Gly Pro Ser Ala Ile Gln Ala
 115 120 125

Asp Ser Arg Thr Asn Ile Arg Ala Ala Asp Gly Ser Leu Val Arg Glu
 130 135 140

Gln Cys Asp Thr Pro Arg Ala Leu Glu Ile Glu Glu Ile Glu Asp Ile
 145 150 155 160

Ile Glu Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Asp Asn Ala Arg Arg Ala Gly Phe
 165 170 175

Asp Met Val Glu Ile His Gly Ala His Gly Tyr Leu Ile Asp Gln Phe
 180 185 190

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

Glu Asn Arg Ala Arg Phe Leu Leu Glu Val Val Asp Ala Val Val Ala
 210 215 220

Glu Trp Asp Ala Asp His Val Gly Ile Arg Ile Ser Pro Leu Gly Ile
 225 230 235 240

Phe Asn Gly Val Ser Asn Thr Asp Gln Leu Asp Met Ala Leu Tyr Leu
 245 250 255

Ala Glu Gln Leu Ala Lys Arg Lys Leu Ala Phe Leu His Ile Ser Glu
 260 265 270

Pro Asp Trp Ala Gly Gly Pro Thr Leu Asp Asp Gly Phe Arg Ala Glu

ES 2 762 703 T3

275

280

285

Leu Arg Gln Arg Tyr Pro Gly Val Ile Ile Gly Ala Gly Gly Tyr Ser
 290 295 300

Ala Glu Lys Ala Glu Thr Leu Leu Lys Lys Gly Phe Ile Asp Ala Ala
 305 310 315 320

Ala Phe Gly Arg Ser Tyr Ile Ala Asn Pro Asp Leu Val Glu Arg Leu
 325 330 335

Lys Gln Asn Ala Pro Leu Asn Pro Pro Lys Pro Asp Thr Phe Tyr Gly
 340 345 350

Gly Gly Ala Glu Gly Tyr Thr Asp Tyr Pro Thr Leu
 355 360

<210> 8

<211> 1095

<212> ADN

5 <213> Chromobacterium violaceum

<400> 8

ES 2 762 703 T3

atgaacgccg acaaactgct gaccccgtg accatgggcg ccgtcgccct gagcaaccgc 60
 gtcgtcatgg ccccgtgac ccgcctgcgc aacatcgaac cgggcgacgt gcccggccg 120
 ctggccaagg aatactaccg ccagcgcgcc agcgcggcc tgatcgtggc cgaaggcacc 180
 cacatttccc ccaccgcaa gggctatgcc ggcgcgcccg gcatctacag cgaggaacaa 240
 gtgcgcgcct ggagcgaagt caccggcgcg gtgcatcaag acggcggcaa gatcgcgctg 300
 caactgtggc acaccggccg catctgcac cgctcgtgc agccgaacgg cgacgcgccg 360
 gtcggcccgt ccgccatcca ggccgacagc cgcaccaaca tccgcgccgc cgacggcagc 420
 ctggtgcgcg aacaatgcga caccocgcgc gcgctggaaa tcgaggaaat cgaggacatc 480
 atcgaggact accgccgcgc cgccgacaac gcgcgccgcg ccggtttcga catggtggag 540
 atccacggcg cccacggcta tctgatcgac cagttcctgt cgccggccgc caacgtccgc 600
 accgaccagt acggcggcag cgtggaaaac cgcgccgcct tcctgctgga agtgggtggac 660
 gcggtggtgg cggaatggga cgccgatcac gtcggcatcc gcatctgcc gctgggcatc 720
 ttcaacggcg tcagcaacac cgaccagctg gacatggcgc tgtacctggc cgagcagttg 780
 gccaaagcga agctggcctt cctgcacatc tccgagccgg actgggccgg cggcccgcag 840
 ctggacgacg gcttccgcgc cgaactgcgc cagcgtatc ccggcgtgat catcggcgcc 900
 ggcggtact ccgcgagaa ggccgaaacg ctgctgaaga aaggctttat cgacgccgcc 960
 gccttcggcc gcagctacat cgccaaccgg gatctggtgg agcgtctgaa gcagaacgct 1020
 ccgctgaacc cgcccaagcc ggatactttc tatggcggcg gcgcggaagg ctataccgac 1080
 taccgcgcgc tgtaa 1095

<210> 9

<211> 338

5 <212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 9

ES 2 762 703 T3

Met Asp Thr Lys Leu Phe Ser Ser Tyr Thr Val Lys Asp Val Thr Leu
1 5 10 15

Lys Asn Arg Ile Val Met Ala Pro Met Cys Met Tyr Ser Ser His Asn
20 25 30

Glu Asp Gly Lys Val Glu Asn Trp His Leu Thr His Tyr Thr Ser Arg
35 40 45

Ala Val Gly Gln Val Gly Leu Ile Ile Val Glu Ala Thr Ala Val Thr
50 55 60

Ala Gln Gly Arg Ile Ser Pro Gln Asp Leu Gly Ile Trp Ser Asp Asp
65 70 75 80

His Ile Glu Gly Leu Gln Gln Leu Thr Gly Met Met Lys Glu His Gly
85 90 95

Thr Arg Ala Gly Ile Gln Leu Ala His Ala Gly Arg Lys Ala Val Ile
100 105 110

Glu Gly Glu Ile Ile Ala Pro Ser Ala Val Ala Phe Asn Glu Lys Met
115 120 125

Lys Lys Pro Lys Glu Met Thr Lys Glu Glu Ile Lys Glu Thr Ile Glu
130 135 140

Ala Phe Lys Glu Gly Ala Val Arg Ala Lys Lys Ala Gly Phe Glu Val
145 150 155 160

Ile Glu Ile His Ala Ala His Gly Tyr Leu Ile Asn Glu Phe Leu Ser
165 170 175

Pro Leu Ser Asn Leu Arg Glu Asp Glu Tyr Gly Gly Ile Ala Glu Asn
180 185 190

Arg Tyr Arg Phe Leu Arg Glu Val Ile Asp Ser Ile Gln Ser Val Trp
195 200 205

ES 2 762 703 T3

Asp Gly Pro Leu Phe Val Arg Val Ser Ala Ser Asp Tyr Asn Glu Asn
 210 215 220

Gly Leu Asp Val Glu Asp Tyr Val Thr Phe Gly Arg Trp Met Lys Glu
 225 230 235 240

Gln Gly Ile Asp Leu Ile Asp Val Ser Ser Gly Ala Leu Val Pro Ala
 245 250 255

Arg Ile His Ala Tyr Pro Gly Tyr Gln Val Lys Phe Ala Glu Thr Ile
 260 265 270

Lys Asn Glu Ala Asp Ile Pro Thr Gly Ala Val Gly Leu Ile Thr Ser
 275 280 285

Gly Leu Gln Ala Glu Glu Ile Leu Gln Asn Asp Arg Ala Asp Leu Ile
 290 295 300

Phe Ile Ala Arg Glu Leu Leu Arg Asp Pro Tyr Phe Pro Lys Thr Ala
 305 310 315 320

Ala Lys Gln Leu Gly Thr Glu Ile Glu Pro Pro Lys Gln Tyr Asp Arg
 325 330 335

Gly Trp

<210> 10

<211> 1017

<212> ADN

5 <213> Bacillus sp.

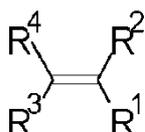
<400> 10

ES 2 762 703 T3

atggacacaa agttatthttc ttcatacaca gtgaaagacg tcacactaaa aaaccgcatc	60
gtcatggcgc cgatgtgcat gtattccagc cataatgaag atggaaaagt agaaaactgg	120
catttgacce attatacaag cagagctggt ggacagggtg gcctgatcat tgtggaagcg	180
accgctgtaa ctgcgcaggg ccgcatttca ccacaggatc tggggatctg gagcgatgat	240
catatcgagg ggctgcagca gctgacaggc atgatgaagg agcatggcac ccgtgccggc	300
atccagcttg cgcagtcagg cagaaaagcg gttattgagg gcgaaatcat tgctccatct	360
gccgtggctt tcaatgaaaa aatgaaaaag cctaaagaga tgacaaaaga agagattaaa	420
gaaacgatcg aagcctttaa ggaaggcgct gtccgtgcta aaaaagcagg cttcgagggt	480
atagaaatcc atgctgcca cggctatctg atcaatgagt ttctatcccc gctttccaat	540
ctgcgggagg atgaatacgg cgggatcgca gaaaaccgct accgcttcct gagggagtc	600
atcgacagca tccagtctgt ttgggacgga cctctctttg taagggtatc agcgagcgat	660
tataacgaaa acggacttga tgttgaggat tatgtcacgt tcgggcgctg gatgaaagag	720
cagggcatcg acctgatcga tgtaagctcc ggagcactgg tgccggcccc cattcacgct	780
tatccaggct accaggtcaa attcgctgaa accatcaaga atgaggcaga catccccaca	840
ggcgccgctg gcctgattac atccggactg caggctgaag agatcctgca aaacgacaga	900
gcagacotta tcttcatcgc acgtgagctg ctccgcgatc catacttccc aaaaaccgca	960
gccaaacagc tcggcaccga aatcgaacct ccgaaacaat atgatagagg gtggtaa	1017

REIVINDICACIONES

1. Uso de un catalizador en un método para reducir un sustrato, comprendiendo el método poner en contacto un sustrato con un catalizador, opcionalmente en presencia de un cosustrato, para generar así un sustrato reducido,
- 5 en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1,
- y en donde en el método la concentración de sustrato es al menos 50 mM.
2. El uso de la reivindicación 1 en donde en el método la concentración de sustrato es al menos 100 mM.
3. El uso de la reivindicación 2 en donde en el método la concentración de sustrato es al menos 300 mM.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el catalizador es un polipéptido que comprende una
- 10 secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1.
5. El uso de la reivindicación 4 en donde el catalizador es un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sustrato tiene un grupo etileno.
7. El uso de la reivindicación 6, en donde el grupo etileno es un grupo etileno activado.
- 15 8. El uso de la reivindicación 6, en donde el grupo etileno es α , β a un grupo acilo, carboxi, aciloxi, acilamino nitro o nitrilo.
9. El uso de la reivindicación 6, en donde el sustrato es un compuesto de fórmula (I):



dónde:

- 20 - R¹ se selecciona independientemente de acilo, carboxilo, aciloxi, nitro, acilamino y nitrilo;
- R² se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, amino, hidroxilo y oxi, y opcionalmente se selecciona adicionalmente de amido;
- R³ es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, amino, hidroxilo, oxi, carboxi, aciloxi, nitrilo y acilamino,
- 25 o donde -R¹ es acilo, aciloxi o acilamino, -R¹ y -R² pueden formar un anillo que contiene el grupo acilo, aciloxi o acilamino o -R¹ y -R³ pueden formar un anillo que contiene el grupo acilo, aciloxi o acilamino;
- R⁴ es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, amino, hidroxilo, oxi, carboxi, aciloxi, nitrilo y acilamino,
- y cada grupo alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclilo y arilo está opcionalmente sustituido;
- 30 o -R² y -R⁴ juntos pueden formar un anillo no sustituido o sustituido.
10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde un cosustrato es un cofactor.
11. El uso de la reivindicación 10, en donde el cofactor es NADH.
12. Un vector que comprende un ácido nucleico, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia establecida como SEQ ID NO: 3,
- 35 en donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1.
13. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 12, o un ácido nucleico, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia establecida como SEQ ID NO: 3, en la que el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una
- 40 secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

Figura 1

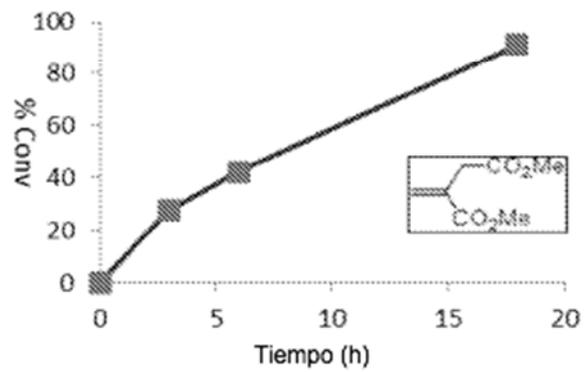
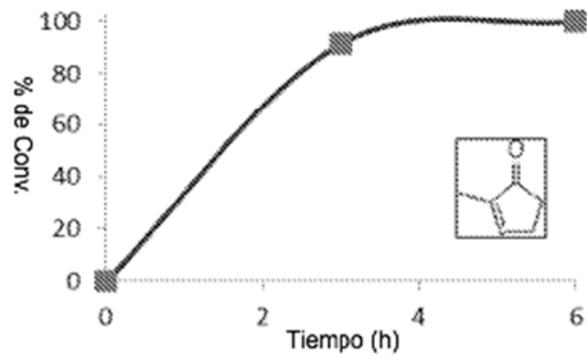
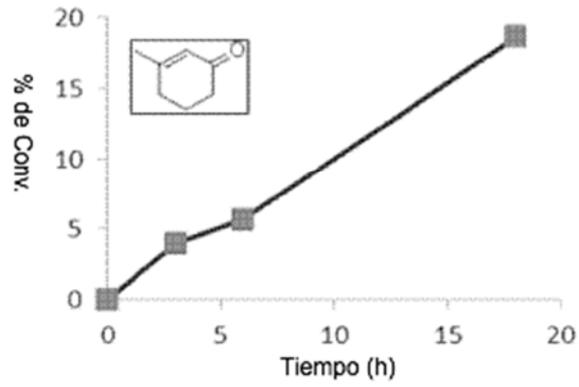
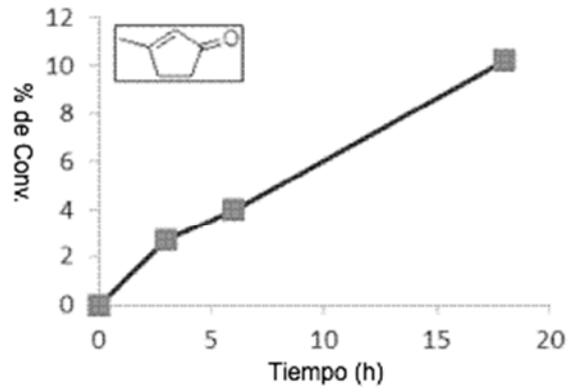


Figura 2

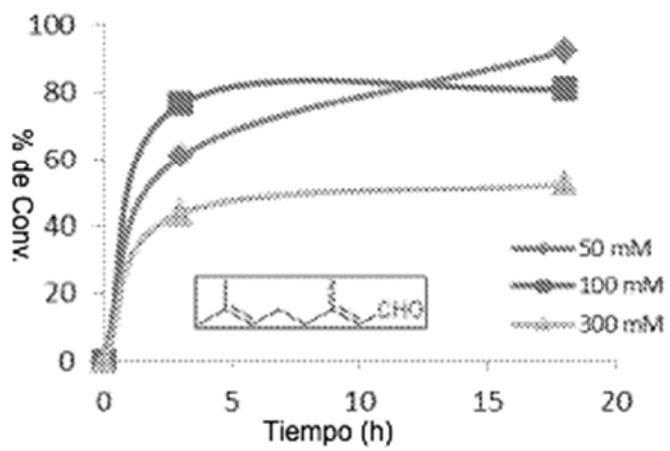
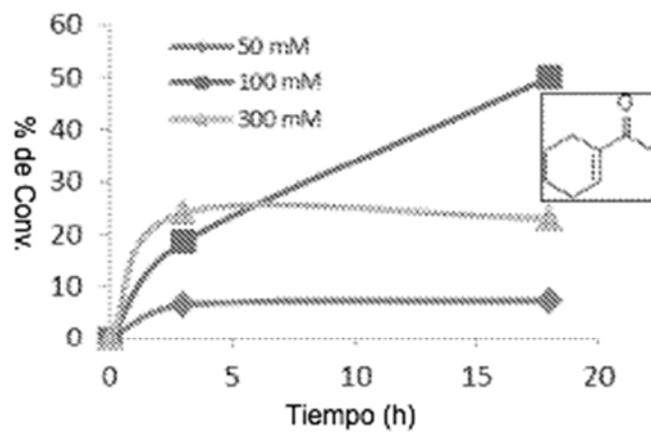
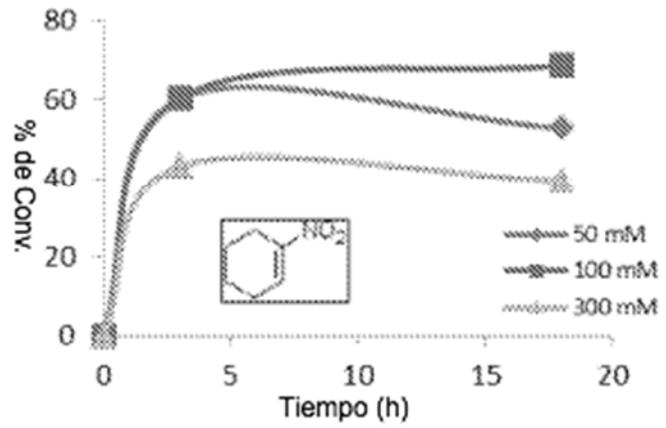


Figura 3

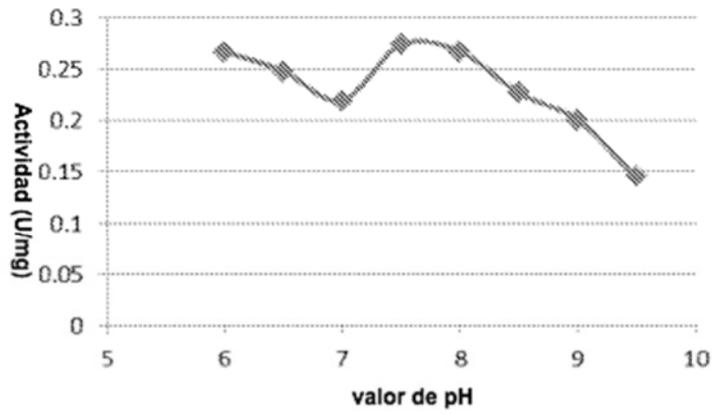


Figura 4

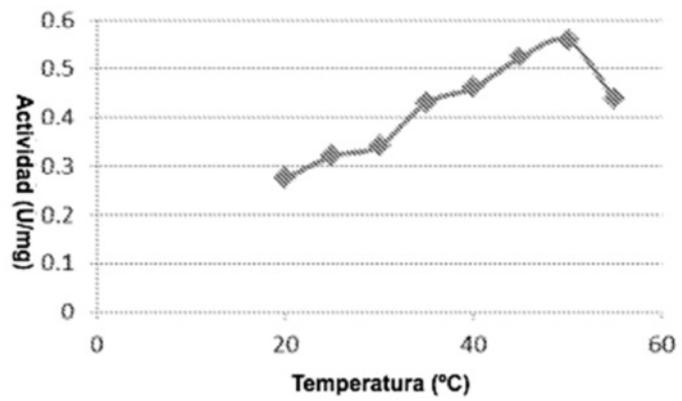


Figura 5

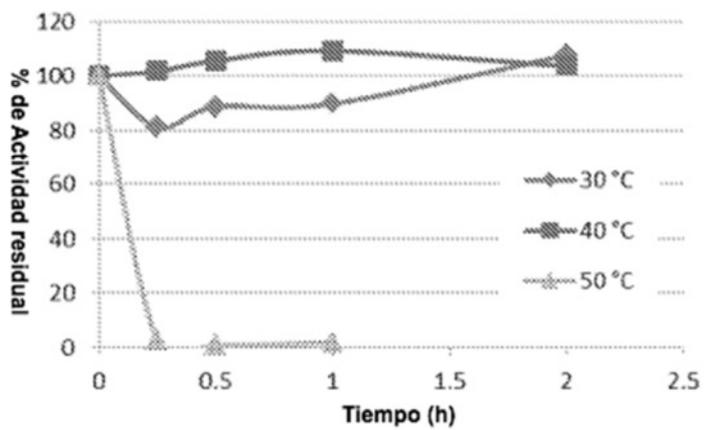


Figura 6

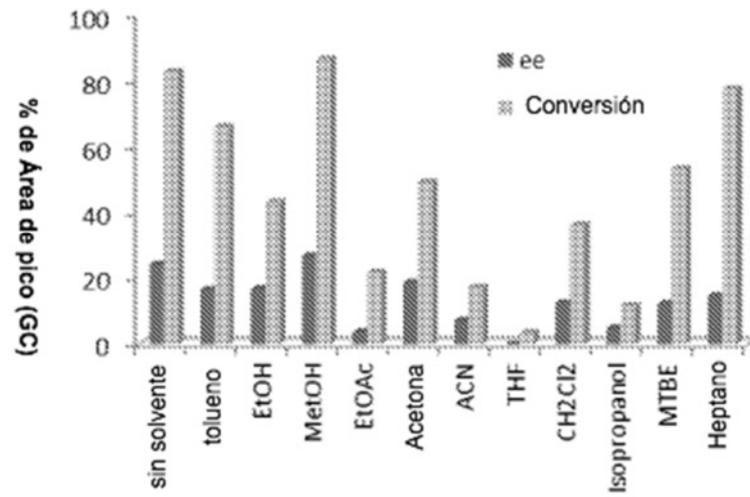


Figura 7

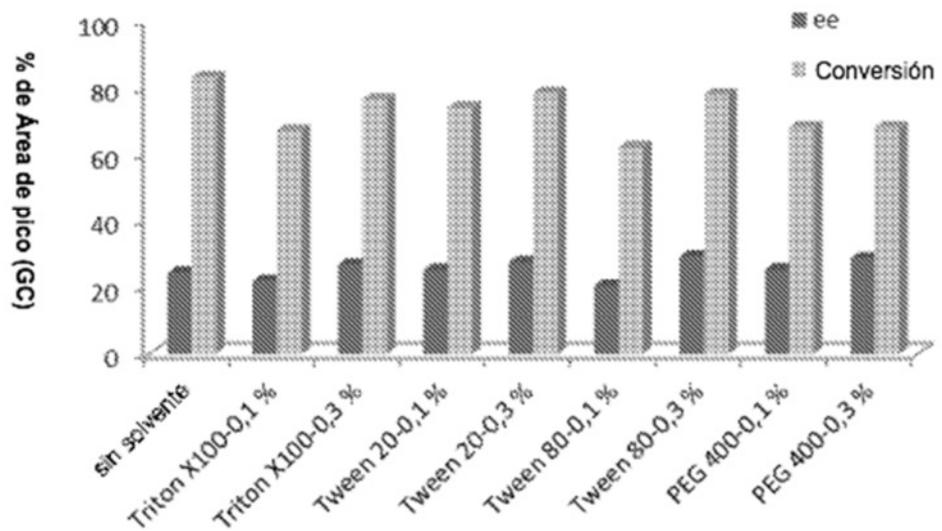


Figura 8

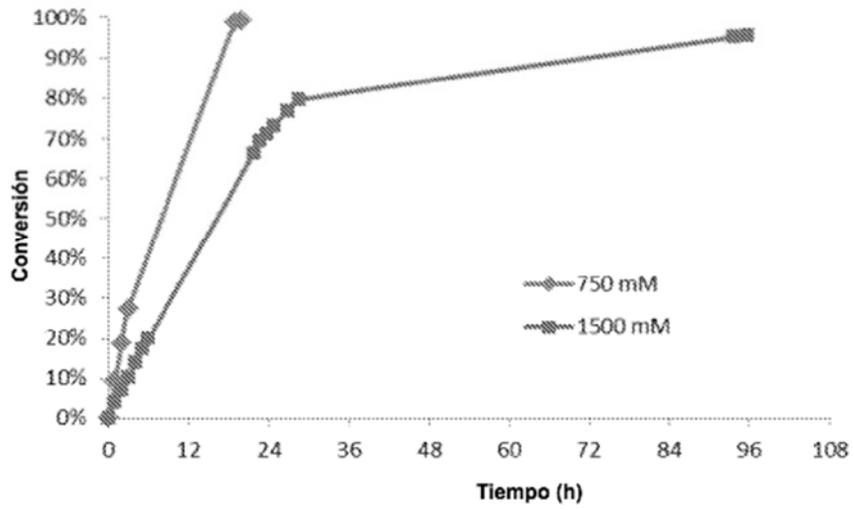


Figura 9

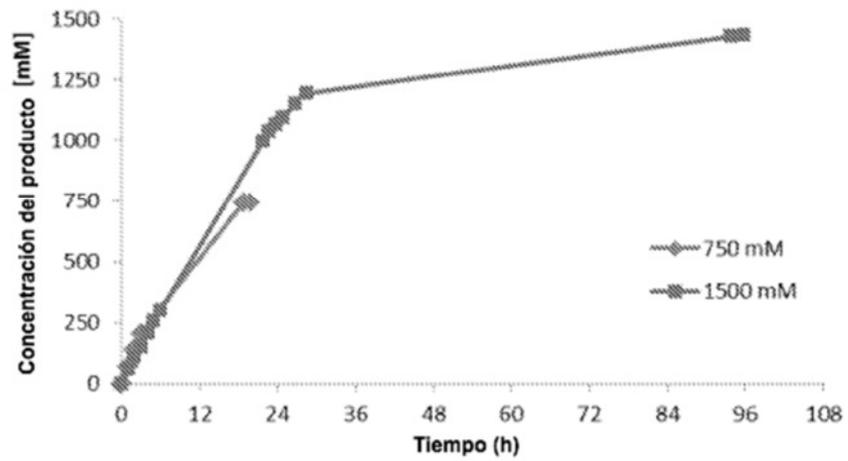


Figura 10

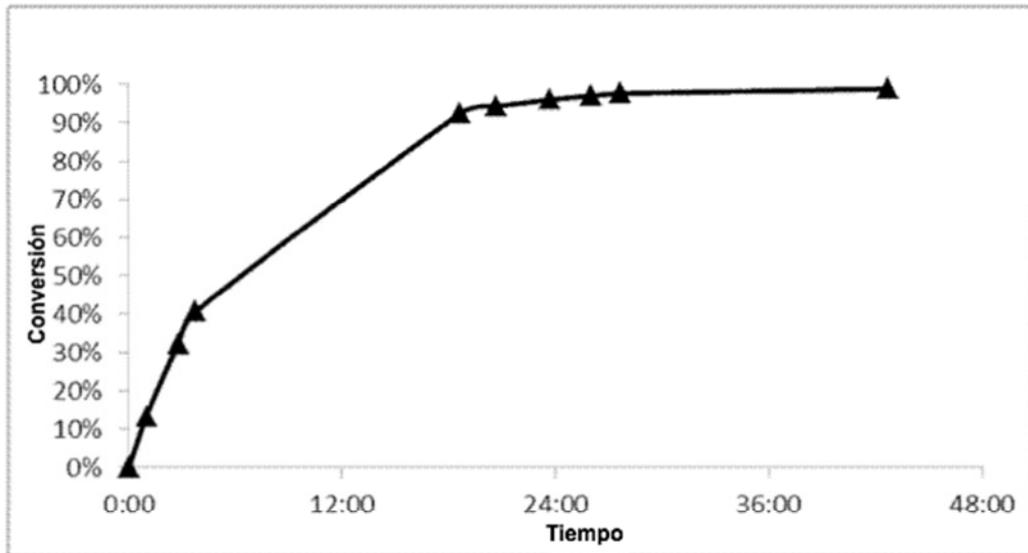


Figura 11

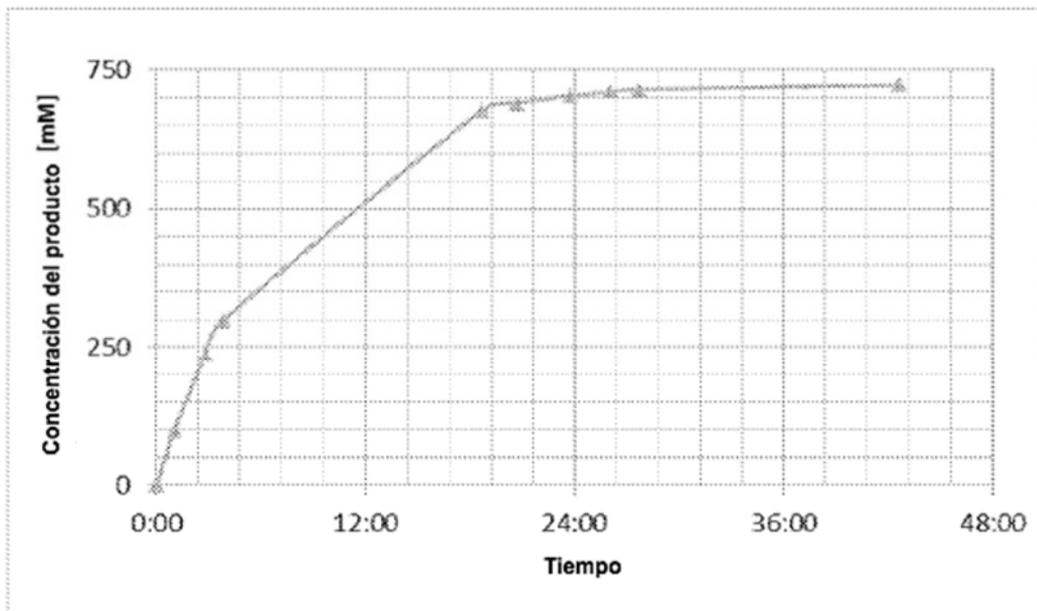


Figura 12

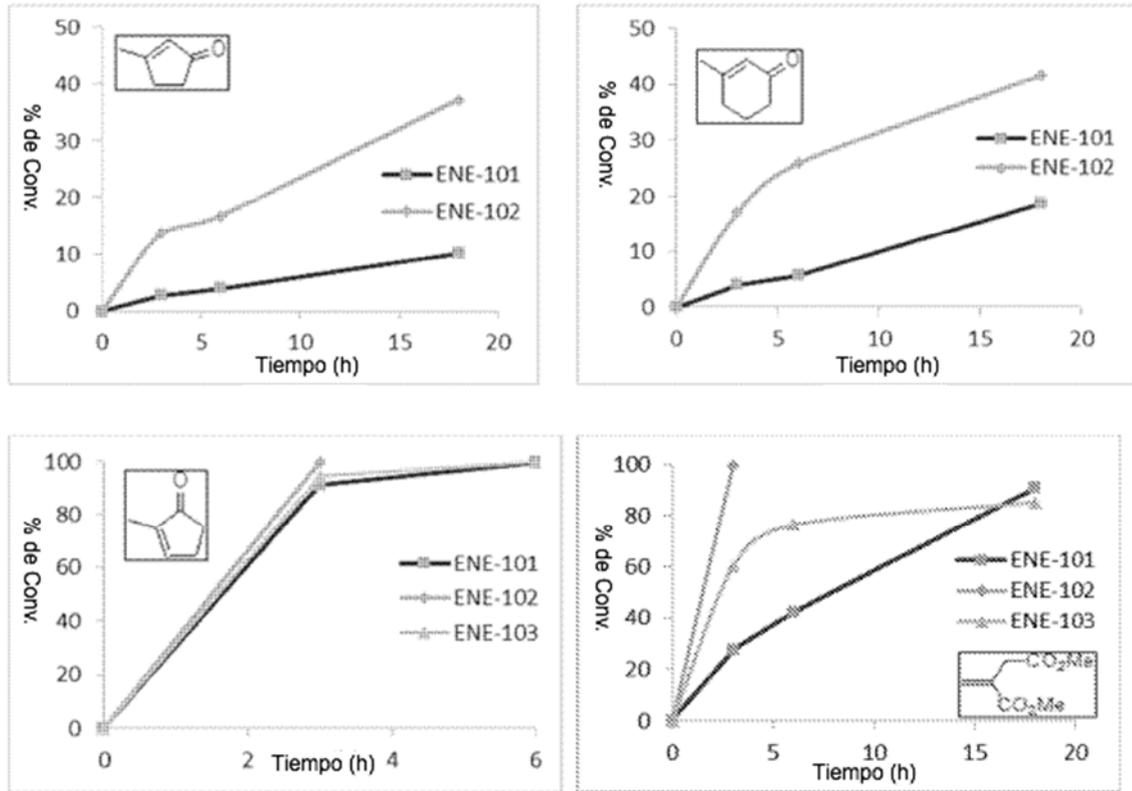


Figura 13A

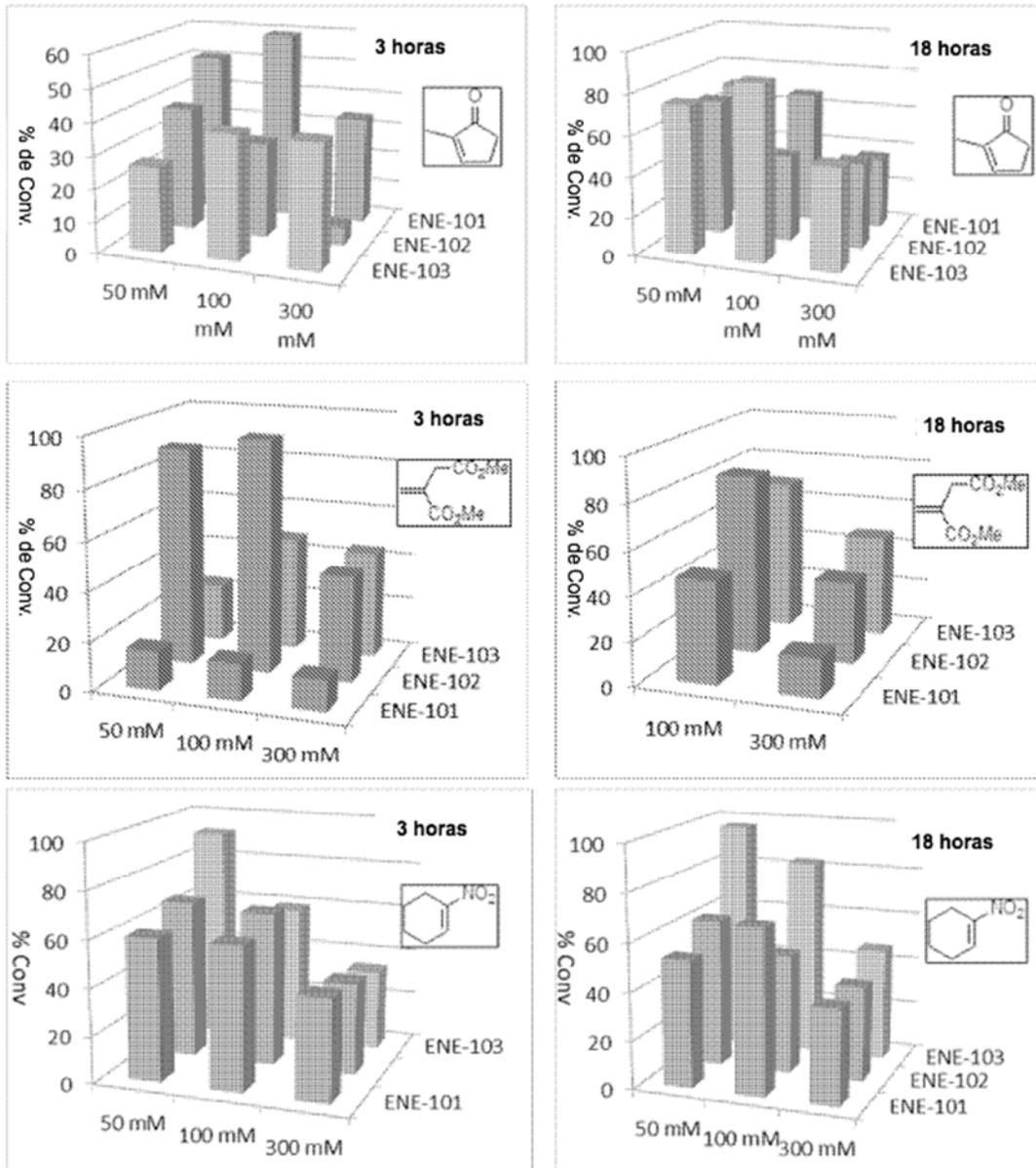


Figura 13B

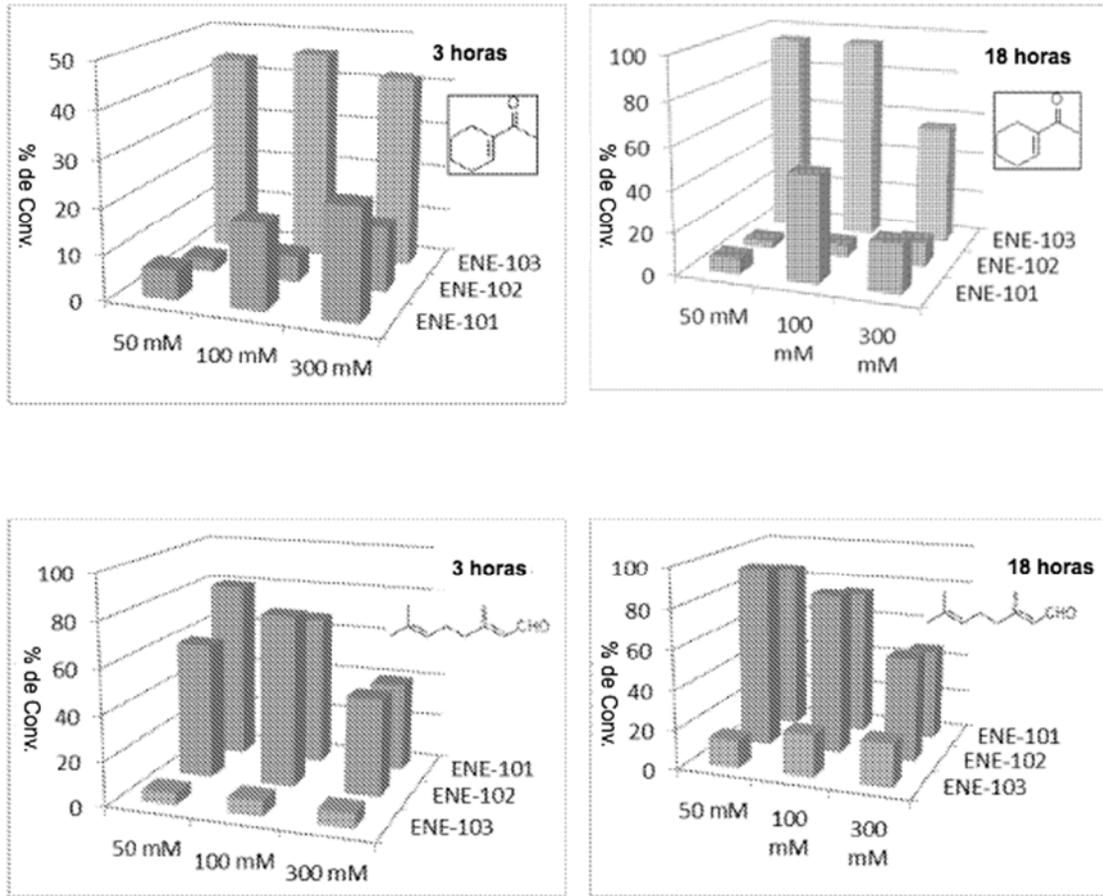


Figura 14

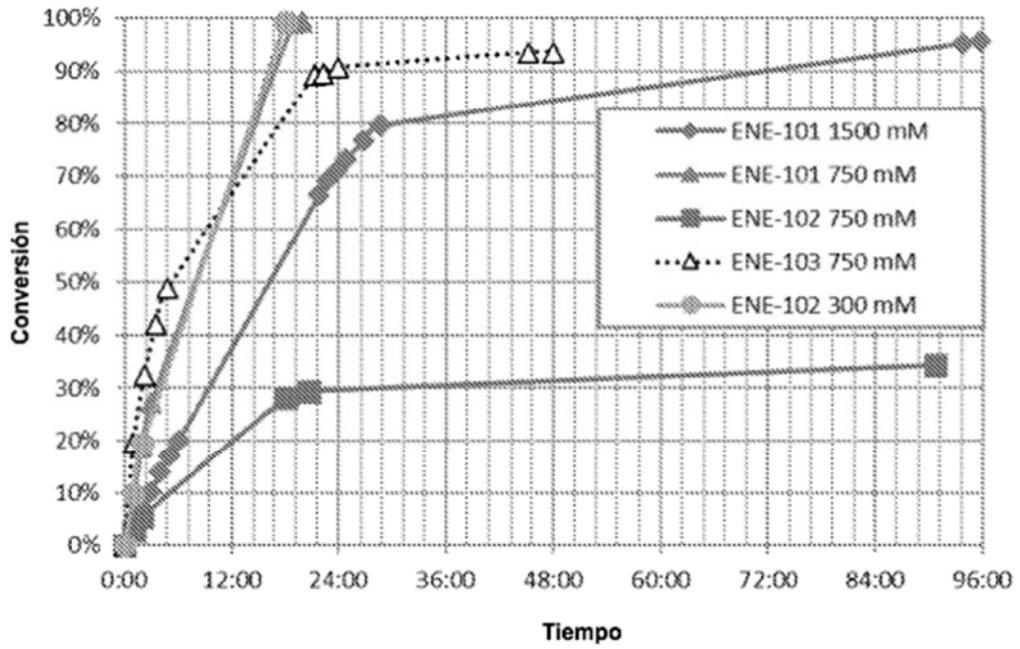


Figura 15

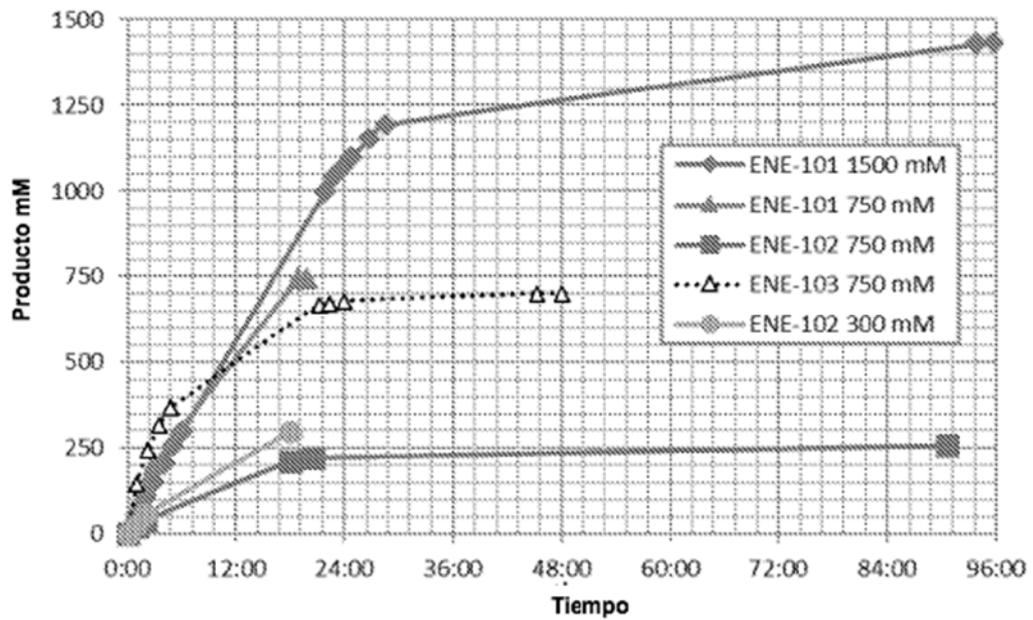


Figura 16

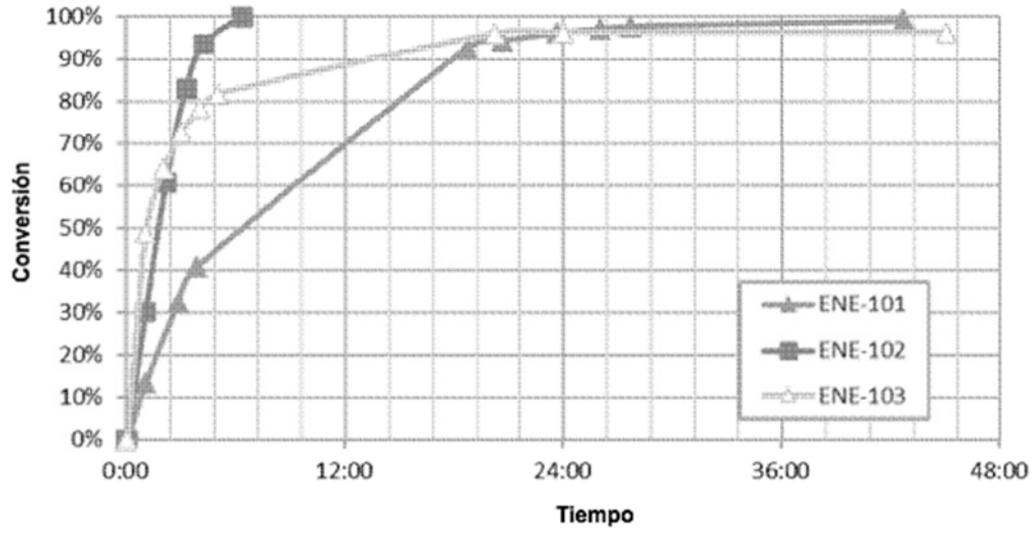


Figura 17

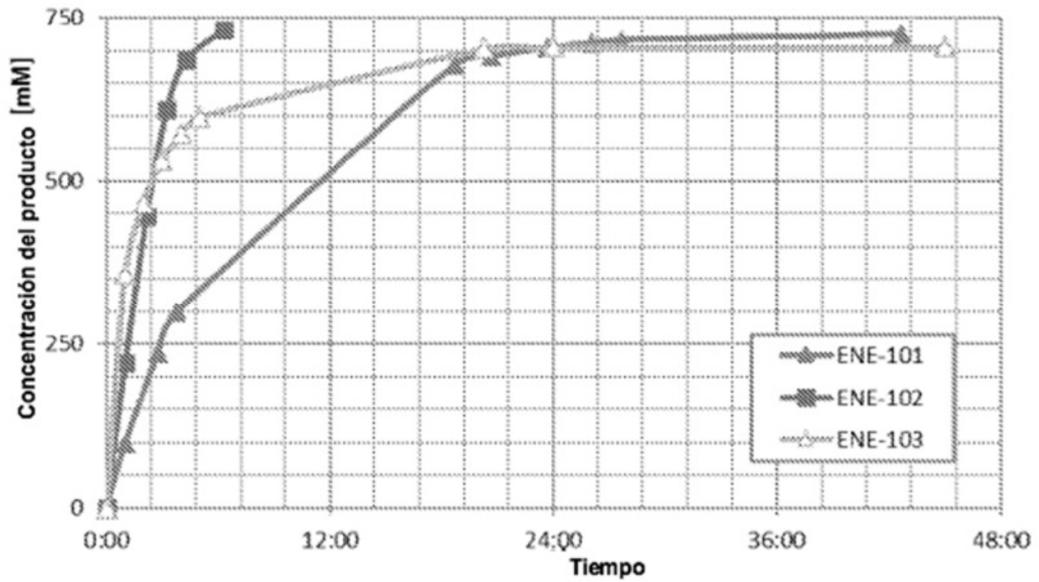


Figura 18

```

ENE103  -MDTKLFSSYTVKDVTLKRNRIVMAPMCMYSSHNEDGKVENWHLTHYTSFAVGGVGLIIVE
ENE101  -MSHTLFDFVQAGDLQLANRIAMAPLTRN--RSPNAVPKDITATYYAQ--RATAGLLITE
ENE102  MNADKLLTPLTMGAVALSNKVVMAPLTKLRNI EPGDVPGLAKEYYRQ--PASAGLIVAE
      . * :           : * * * : * * * :           . * :           . * * * : *
      :           :           :           :           :           :           :

ENE103  ATAVTAQGRIS PQDLGIWSDDHIEGLQQLTGMMKENGTRAGIQLAHAGPKAVIE-----G
ENE101  ATAI SHQGGQYADVPGLYSTEQLDGWKKVTAAVHERGGRIVTQLWHVGRISHNDLQPDGG
ENE102  GTHISPTAKGYAGAPGIYSEEQVRAWSEVTGAVHQDGGKIALQLWHTGRI SHFSLQPNGD
      . * : :           * : * : * : :           . * : :           * * * : * :
      :           :           :           :           :           :           :

ENE103  EIIAPSAVAF-----NEKMKPKEMTKKEIKETIEAPREGAVFA--KKAGF
ENE101  APVAPSAIAAKSKTYLIDKATGQGHFAATSEPPALDAEELPGIVHDYAAAARNAVETAGF
ENE102  APVGP SAIQADSPTNIR--AADGSLVREQCDTPRALEIEEIEDIIEDYRRAADNA--RRAGF
      : * * * :           . * : :           * * :           : :           . * * * : * * *
      :           :           :           :           :           :           :

ENE103  EVIEIHAHAGYLINEFLSPLSNLREDEYGGIAENRYRFLREVIDSIQSVWDGGLF--VRVS
ENE101  DGVEIHGANGYLLDQFLKTGANRRTDYGGSIENPARLLEATPAVVDAI GGGVGVIPLS
ENE102  DMVEIHGANGYLIDQFLSPAANVPTDQYGGSVENKARFLELVDAVVAEWDADHVGIKIS
      : : * * * : * * * : : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *
      :           :           :           :           :           :           :

ENE103  ASDY-----NENGLDVEDYVTFGPWMKEQGI DLIDVSSGALVPARI-----HAYPGYQVK
ENE101  PVT PANDIVDADPQPLFDYVI--RQLAPLGLAYVHVI EGSTGGPRELED RPF DYEALKTA
ENE102  PLGIFNGVSNTDQLDMALYLA--EQLAKFKLAF LHI SEPDWAGGPTLDDG--FRAE--LRQR
      : :           : * :           . :           : : * :           . :           :
      :           :           :           :           :           :           :

ENE103  FAETIKNEADIF TGAVGLITSGLQAEIILQNDRADLI FLARELLRDPYFPKTAAKQLGTE
ENE101  YREAGGKGAWMVNN-----AYDRALAMEAVASGFADIVAFGHAFISNPDLVERLRQDA--P
ENE102  Y-----PGVIIIGAG-----GYSAEKAETLLKKGPI DAAAFGRSYIANPDLVERLRQNA--P
      :           . :           . * :           . * :           : * :           : * :           :
      :           :           :           :           :           :           :

ENE103  IEPPK---QYDRG---W-----
ENE101  LNPWDSKTFYGGGEGYTDYPTLGSAGK
ENE102  LNPFPKPTFYGGGAEGYTDYPTL-----
      : : *           * * :           :
      :           :           :           :           :           :

```