



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 277**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12N 1/15** (2006.01)

**C12N 1/19** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 9/04** (2006.01)

**C12P 13/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05767288 .3**

96 Fecha de presentación : **01.08.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1792986**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

54

Título: **Nueva carbonil reductasa, gen que la codifica y método de uso de la misma.**

30

Prioridad: **06.08.2004 JP 2004-231226**

73

Titular/es: **KANEKA CORPORATION**  
**2-4, Nakanoshima 3-chome**  
**Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8288, JP**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

72

Inventor/es: **Kizaki, Noriyuki;**  
**Yano, Miho;**  
**Funaki, Masahiro;**  
**Takesue, Teruaki;**  
**Yasohara, Yoshihiko;**  
**Morikawa, Souichi;**  
**Nakai, Takahisa;**  
**Kataoka, Michihiko y**  
**Shimizu, Sakayu**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 317 277 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

Nueva carbonil reductasa, gen que la codifica y método de uso de la misma.

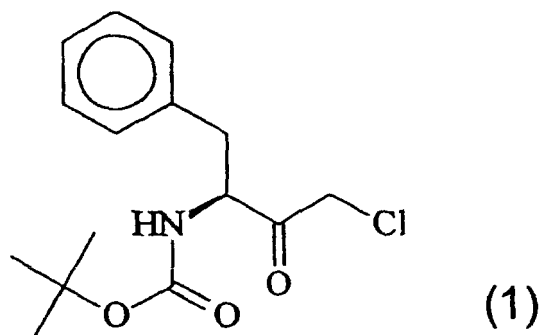
5 **Campo técnico**

El presente invento se refiere a un polipéptido (carbonil reductasa) que tiene una actividad para reducir asimétricamente (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona, representada por la fórmula (1) siguiente:

10

15

20

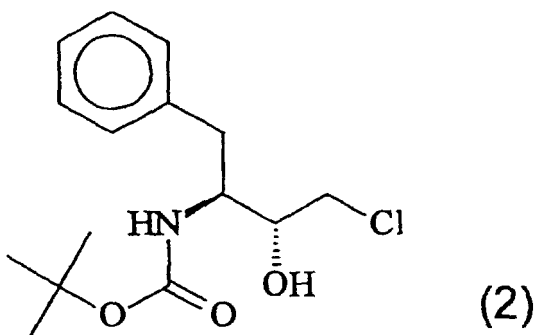


25 para producir (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, representado por la fórmula (2) siguiente:

30

35

40



que es aislado de un microorganismo que tiene la actividad, un DNA que codifica el polipéptido, un vector que contiene el DNA, y una célula transformada con el vector.

45

El presente invento también se refiere a un método para la producción de un alcohol ópticamente activo, particularmente (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonil-amino-4-fenil-2-butanol, representado por la fórmula (2) anteriormente mencionada, usando el polipéptido o la célula transformada.

50

El (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol es un compuesto útil como material de partida sintético para un agente farmacéutico y similares.

**Técnica fundamental**

55

En cuanto al método para la producción de (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, se conoce un método que comprende reducir químicamente un derivado amino-prottegido de (3S)-1-halo-3-amino-4-fenil-2-butanona con un agente reductor tal como borohidruro sódico y similares (referencia 1 de patente, referencia 1 de no patente). Sin embargo, este método requiere un agente reductor comparativamente caro, y la estereoselectividad del mismo no es prácticamente suficiente.

60

Además, en cuanto a un método en que se utiliza un microorganismo, se conocen un método que comprende dejar que un microorganismo perteneciente al género *Candida* y similares actúe sobre un derivado de (3S)-1-halo-3-amino-4-fenil-2-butanona para producir un derivado de (2R,3S)-1-halo-3-amino-4-fenil-2-butanol (referencia 2 de patente), y un método que comprende poner un microorganismo perteneciente al género *Rhodococcus* y similares en contacto con (3S)-1-halo-2-oxo-3-amino protegido-4-butano sustituido para producir (2R,3S)-1-halo-2-hidroxi-3-amino protegido-4-butano sustituido (referencia 3 de patente, referencia 2 de no patente). Sin embargo, mediante estos métodos, puede que la concentración del producto que se puede acumular en la mezcla de reacción no sea prácticamente suficiente.

65

Referencia 1 de patente: JP-A-2-42048.

Referencia 2 de patente: JP-A-9-285.

5 Referencia 3 de patente: WO2002/014528.

Referencia 1 de no patente: Tetrahedron 50, 6333 (1994).

10 Referencia 2 de no patente: Tetrahedron:Asymmetry 14, 3105 (2003).

## Descripción del invento

### Problemas que han de ser resueltos por el invento

15 A la vista de lo anterior, el presente invento pretende proporcionar un polipéptido útil para la producción de (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, un DNA que codifica el polipéptido, un vector que contiene el DNA, y una célula transformada con el vector.

20 Además, el presente invento pretende proporcionar un método para la producción eficaz de diversos alcoholes ópticamente activos, incluyendo (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, utilizando el polipéptido o la célula transformada.

### Medios para resolver los problemas

25 Los presentes inventores han aislado un polipéptido que tiene una actividad para reducir asimétricamente (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona, para producir (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, de un microorganismo que tiene la actividad. Además, han tenido éxito a la hora de aclarar la secuencia de bases de un DNA que codifica el polipéptido y generar una célula transformada que produce el polipéptido en grandes cantidades utilizando la secuencia. Además, han hallado que diversos alcoholes ópticamente activos útiles, tal como (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, pueden ser eficazmente producidos al utilizar el polipéptido o la célula transformada, lo que dio lugar a la compleción del presente invento.

30 Es decir, el presente invento se dirige a un polipéptido que tiene una actividad para reducir asimétricamente (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona para producir (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol.

35 Además, el presente invento proporciona un DNA que codifica el polipéptido. Más aún, el presente invento proporciona un vector que contiene el DNA. Además, el presente invento proporciona una célula transformada que contiene el vector. Además, el presente invento proporciona un método para la producción de alcoholes ópticamente activos, incluyendo (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, utilizando el polipéptido o la célula transformada.

### Efecto del invento

45 De acuerdo con el presente invento, se puede proporcionar un método práctico para la producción de alcoholes ópticamente activos útiles, incluyendo (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol.

### Breve descripción del dibujo

50 La Figura 1 muestra un método de producción y una estructura de un vector recombinante pNTOM4G1.

### Mejor modo para materializar el invento

55 A continuación, se explica el presente invento con detalle.

60 La (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona descrita en la presente memoria descriptiva puede ser preparada, por ejemplo, mediante el método descrito en el documento JP-A-62-126158 o JP-A-2-42048. Además, a menos que se especifique otra cosa, el aislamiento del DNA, la preparación del vector y la manipulación génica, tal como la transformación descrita en la presente memoria descriptiva, se pueden llevar a cabo mediante métodos descritos en libros tales como "Molecular Cloning", 2ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) y similares. Además, el "%" utilizado en la descripción de la presente memoria descriptiva significa "% (peso/volumen)" a menos que se especifique otra cosa.

65 El polipéptido del presente invento es un polipéptido que tiene una actividad para reducir asimétricamente (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona para producir (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol. Dicho polipéptido puede ser aislado de un microorganismo que tiene la actividad.

## ES 2 317 277 T3

Aunque el microorganismo que va a ser el origen del polipéptido del presente invento no está particularmente limitado, se puede utilizar, por ejemplo, una levadura perteneciente al género *Ogataea*. Se prefiere particularmente la cepa NBRC0975 de *Ogataea minuta* var. *minuta*. El microorganismo se puede obtener del organismo administrativo incorporado "National Institute of Technology and Evaluation, Biological Resource Center" (NBRC: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi 292-0818 Chiba, Japón).

En cuanto al medio para cultivar el microorganismo que va a ser el origen del polipéptido del presente invento, se pueden utilizar medios nutritivos líquidos generales que incluyan fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, nutrientes orgánicos y similares, con tal de que el microorganismo crezca.

El polipéptido del presente invento puede ser aislado del microorganismo que va a ser el origen del polipéptido combinando apropiadamente métodos para purificación de proteínas generalmente conocidos. Por ejemplo, el aislamiento puede ser llevado a cabo del modo siguiente.

En primer lugar, se cultiva el microorganismo en un medio adecuado y se recogen las células del medio de cultivo mediante centrifugación o filtración. Las células obtenidas son rotas mediante un medio físico usando un disgregador ultrasónico, glóbulos de vidrio y similares, y los fragmentos celulares son separados por centrifugación para obtener un extracto exento de células. A continuación, el polipéptido del presente invento es aislado del extracto exento de células mediante métodos tales como precipitación salina (precipitación con sulfato amónico, precipitación con fosfato sódico, y similares), precipitación con disolvente (precipitación y fraccionamiento de proteínas mediante acetona, etanol y similares), diálisis, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en fase inversa, ultrafiltración o similares, solos o en combinación.

La actividad para reducir (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona se puede determinar, por ejemplo, añadiendo un sustrato 0,2 mM, (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona, una coenzima 0,25 mM, NADPH, y una enzima cruda a un tampón de fosfato 100 mM (pH de 6,5) que contiene dimetilsulfóxido al 0,33% (volumen/volumen), dejando reaccionar la mezcla a 30°C durante 1 minuto y calculando la actividad a partir del índice de disminución de la absorbancia a la longitud de onda de 340 nm después de la reacción.

Además, la determinación de la configuración absoluta y la medición del exceso diastereomérico del (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol producido mediante la reacción anteriormente mencionada se pueden llevar a cabo mediante cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC; del inglés, high performance liquid chromatography) [columna: COSMOSIL 5C8-MS (4,6 mm de diámetro x 250 mm; fabricada por Nacalai Tesque); eluyente: disolución acuosa de ácido fosfórico 10 mM/acetónitrilo = 1/1 (volumen/volumen); caudal: 1 ml/min; detección: 210 nm].

El DNA del presente invento es un DNA que codifica el susodicho polipéptido del presente invento, y puede ser cualquiera con tal de que pueda hacer que se exprese el polipéptido en una célula huésped transformada de acuerdo con el método mencionado más adelante, y puede contener cualquier región no traducida. Una vez que se puede conseguir el polipéptido, quienes tienen una experiencia normal en la técnica pueden obtener dicho DNA mediante un método conocido a partir del microorganismo que va a ser el origen del polipéptido. Por ejemplo, puede obtenerse mediante el método siguiente.

En primer lugar, se somete un polipéptido aislado del presente invento a digestión con una endopeptidasa adecuada y se fraccionan los fragmentos peptídicos resultantes mediante HPLC en fase inversa. A continuación, por ejemplo, utilizando un secuenciador de proteínas ABI492 (fabricado por Applied Biosystems), se determina una parte de la secuencia completa de aminoácidos de los fragmentos peptídicos.

Basándose en la información sobre la secuencia de aminoácidos obtenida de esta manera, se sintetizan cebadores de PCR (reacción en cadena de la polimerasa; del inglés, polymerase chain reaction) para multiplicar una parte de un DNA que codifica el polipéptido. A continuación, se prepara DNA cromosómico del microorganismo que va a ser el origen del polipéptido mediante un método general para aislamiento de DNA, tal como, por ejemplo, el método de Visser y otros [Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 415 (2000)]. Utilizando el DNA cromosómico como molde y los cebadores de PCR anteriormente mencionados, se lleva a cabo una PCR para multiplicar una parte del DNA que codifica el polipéptido y determinar la secuencia de bases del mismo. La secuencia de bases puede ser determinada, por ejemplo, utilizando el secuenciador de DNA ABI373A (fabricado por Applied Biosystems) y similares.

Una vez que se ha aclarado una parte de la secuencia de bases del DNA que codifica el polipéptido, se puede determinar la secuencia de longitud completa mediante, por ejemplo, i-PCR [Nucl. Acids Res. 16, 8186 (1988)].

Los ejemplos del DNA del presente invento, obtenido de esta manera, incluyen un DNA que contiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1 y un DNA que contiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2. Además, el DNA del presente invento también abarca un DNA que se hibrida con un DNA que consiste en una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 bajo condiciones rigurosas, que codifica un polipéptido que tiene una actividad para reducir asimétricamente (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona para producir (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol.

## ES 2 317 277 T3

El DNA que se hibrida con un DNA que consiste en una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 bajo condiciones rigurosas se refiere a un DNA que forma específicamente un híbrido con un DNA que tiene una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, cuando se lleva a cabo un método de hibridación de colonias, un método de hibridación de placas, un método de hibridación Southern o similar.

Cómo se usan aquí, las condiciones rigurosas se refieren a, por ejemplo, las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo una hibridación en una disolución acuosa con una composición de citrato trisódico 75 mM, cloruro sódico 750 mM, dodecilsulfato sódico al 0,5%, albúmina sérica bovina al 0,1%, polivinilpirrolidona al 0,1% y Ficoll 400 al 0,1% (fabricado por Amersham Biosciences) a 65°C, seguida de un lavado con una disolución acuosa con una composición de citrato trisódico 15 mM, cloruro sódico 150 mM y dodecilsulfato sódico al 0,1% a 60°C. Preferiblemente, se refieren a las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el lavado con una disolución acuosa con una composición de citrato trisódico 15 mM, cloruro sódico 150 mM y dodecilsulfato sódico al 0,1% a 65°C, después de la hibridación, bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Más preferiblemente, se refieren a las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el lavado con una disolución acuosa con una composición de citrato trisódico 1,5 mM, cloruro sódico 15 mM y dodecilsulfato sódico al 0,1% a 65°C, después de la hibridación, de la misma manera que antes.

Los ejemplos del polipéptido del presente invento incluyen un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, codificado por la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1, y un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, codificado por la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2.

Además, un polipéptido que muestre al menos un cierto nivel de homología con respecto a cualquiera de estas dos clases de polipéptidos y que tenga una actividad para reducir asimétricamente (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona para producir (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol es funcionalmente equivalente a estas dos clases de polipéptidos y está incluido en el presente invento.

Cómo se usa aquí, la homología de la secuencia se expresa, por ejemplo, mediante el valor de identidad con respecto a la secuencia completa cuando dos secuencias de aminoácidos son comparativamente analizadas utilizando un programa FASTA para búsqueda de homologías [W. R. Pearson y D. J. Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448 (1988)]. Los ejemplos del polipéptido equivalente al polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4 incluyen un polipéptido que muestra no menos de 78% (la homología entre el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 3 y el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 4 es 78%), preferiblemente no menos de 80%, más preferiblemente no menos de 85%, aún más preferiblemente no menos de 90%, de homología con respecto a cualquiera de estas dos clases de polipéptidos.

Dicho polipéptido puede ser obtenido, por ejemplo, ligando un DNA que se puede hibridar con un DNA que consiste en una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases mostrada mediante la susodicha SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 bajo condiciones rigurosas, en un vector adecuado e introduciendo el vector en una célula huésped adecuada para permitir la expresión. Además, dicho polipéptido puede ser obtenido, por ejemplo, causando una sustitución, inserción, supresión o adición de aminoácido en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4, de acuerdo con un conocido método descrito en "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley and Sons, Inc., 1989) y similares.

Los ejemplos del polipéptido obtenido mediante el último método incluyen un polipéptido obtenido al sustituir la 42ª alanina por glicocola, el 43º ácido glutámico por alanina, la 46ª lisina por ácido glutámico y/o la 49ª asparagina por lisina en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En la SEQ ID NO: 16 se muestra un polipéptido que tiene estas cuatro mutaciones (polipéptido mutante 1) y, en la SEQ ID NO: 15, se muestra un DNA que codifica el polipéptido (DNA mutante 1).

El vector que se va a utilizar para introducir el DNA del presente invento en un microorganismo huésped para permitir la expresión del DNA en el microorganismo huésped no está particularmente limitado con tal de que el DNA pueda expresar el gen codificado en un microorganismo huésped adecuado. Los ejemplos del vector incluyen un vector de plásmido, un vector de fago, un vector de cósmido y similares. Además, también se puede usar un vector lanzadera capaz de intercambio génico con otras células huésped.

Dicho vector contiene generalmente un regulador tal como el promotor lacUV5, el promotor trp, el promotor trc, el promotor tac, el promotor lpp, el promotor tufB, el promotor recA, el promotor pL y similares, y se puede utilizar preferiblemente como un vector de expresión que contiene una unidad de expresión operativamente unida al DNA del presente invento. Por ejemplo, se puede utilizar preferiblemente pUCNT (documento WO94/03613).

El término "regulador" usado en la presente memoria descriptiva se refiere a una secuencia de bases que tiene un promotor funcional y cualquier elemento transcripcional relacionado (por ejemplo, potenciador, caja CCAAT, caja TATA, grupo SPI y similares).

El término "operativamente unido" usado en la presente memoria descriptiva significa que diversos elementos reguladores tales como un promotor, un potenciador y similares, que controlan la expresión génica, y un gen están co-

nectados en un estado operativo en una célula huésped. Es un asunto bien conocido por quienes tienen una experiencia normal en la técnica que el tipo y la clase de regulador pueden variar dependiendo del huésped.

5 Los ejemplos del vector de expresión del presente invento incluyen pNTOM3, en el que el DNA mostrado en la SEQ ID NO: 1 ha sido introducido en pUCNT, pNTOM4, en el que el DNA mostrado en la SEQ ID NO: 2 ha sido introducido en pUCNT, pNTOM5, en el que el DNA mostrado en la SEQ ID NO: 15 ha sido introducido en pUCNT, los cuales se mencionan más adelante, y similares.

10 En cuanto a la célula huésped en que se introduce un vector que contiene el DNA del presente invento, se puede utilizar una bacteria, una levadura, una bacteria filamentosa, una célula vegetal, una célula animal o similar. Puesto que la introducción y/o el cultivo son fáciles, es preferible una bacteria y es particularmente preferible *Escherichia coli*. El vector que contiene el DNA del presente invento puede ser introducido en una célula huésped mediante un método conocido. Cuando se utiliza *Escherichia coli* como célula huésped, se puede usar, por ejemplo, una célula competente de *E. coli* HB101 comercialmente asequible (fabricada por TAKARA BIO) para introducir el vector en la célula huésped.

20 Los ejemplos de la célula transformada del presente invento incluyen *E. coli* HB101 (pNTOM3) FERM BP-10368, en que el susodicho pNTOM3 ha sido introducido en *E. coli* HB101, *E. coli* HB101 (pNTOM4) FERM BP-10369, en que el susodicho pNTOM4 ha sido introducido en *E. coli* HB101, *E. coli* HB101 (pNTOM5) FERM BP-10370, en que el susodicho pNTOM5 ha sido introducido en *E. coli* HB101, las cuales se mencionan más adelante, y similares. Estas células transformadas han sido respectivamente depositadas bajo los susodichos números de acceso en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository (IPOD; Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8566, Japón) (fecha del depósito original en Japón: 3 de Junio de 2004; las cepas nacionales depositadas fueron transferidas al depósito internacional basándose en el Tratado de Budapest del 6 de Julio de 2005).

30 Cuando un compuesto que tiene un grupo carbonilo es asimétricamente reducido para producir un alcohol ópticamente activo utilizando el polipéptido del presente invento, se hace necesaria una coenzima tal como NADH, NADPH o similar. Sin embargo, la cantidad de la costosa coenzima que se va a utilizar puede ser drásticamente reducida llevando a cabo la reacción en la presencia conjunta de un polipéptido capaz de convertir la coenzima oxidada en una forma reducida (a lo que se hace más adelante referencia como "capacidad para regenerar la coenzima"), un compuesto que va a ser el sustrato del polipéptido, y el polipéptido del presente invento.

35 En cuanto al polipéptido que tiene la capacidad para regenerar la coenzima, se puede utilizar, por ejemplo, hidrogenasa, ácido fórmico deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa o similar. Se utiliza preferiblemente glucosa deshidrogenasa.

40 El alcohol ópticamente activo puede ser producido utilizando el polipéptido del presente invento del modo siguiente. En primer lugar, se añaden un compuesto que tiene un grupo carbonilo que va a ser el sustrato, una coenzima tal como NADPH o similar, y el polipéptido a un disolvente adecuado y se agita la mezcla bajo un pH ajustado para que se lleve la reacción a cabo. Cuando la reacción se lleva a cabo utilizando una combinación del polipéptido del presente invento y de un polipéptido que tiene capacidad para regenerar la coenzima, a la composición de reacción anteriormente mencionada se añaden además un polipéptido que tiene capacidad para regenerar la coenzima (por ejemplo, glucosa deshidrogenasa) y un compuesto (por ejemplo, glucosa) que va a ser su sustrato.

45 Se puede utilizar un disolvente acuoso para la reacción o se puede utilizar una mezcla de un disolvente acuoso y un disolvente orgánico para la reacción. Los ejemplos del disolvente orgánico incluyen tolueno, acetato de etilo, acetato de n-butilo, hexano, isopropanol, éter diisopropílico, metanol, acetona, dimetilsulfóxido y similares. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 10°C - 70°C, y el pH de la mezcla de reacción se mantiene en un valor de 4 - 10. La reacción puede ser llevada a cabo mediante un proceso discontinuo o un proceso continuo. Para un proceso discontinuo, el sustrato de reacción se añade en una concentración de carga de 0,1% a 70% (peso/volumen). Los ejemplos del compuesto que tiene un grupo carbonilo que va a ser el sustrato incluyen (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona. Sin embargo, el compuesto no está particularmente limitado con tal de que pueda ser reducido bajo las condiciones de reacción anteriormente mencionadas y pueda ser convertido en un alcohol ópticamente activo.

50 La reacción puede ser llevada similarmente a cabo incluso cuando, en lugar del polipéptido del presente invento, se utiliza una célula transformada que contiene un DNA que codifica el polipéptido, o un producto tratado de la misma. Además, la reacción puede ser llevada similarmente a cabo incluso cuando se utiliza una célula transformada que contiene tanto un DNA que codifica el polipéptido del presente invento como un DNA que codifica un polipéptido que tiene capacidad para regenerar la coenzima, o un producto tratado de la misma. El "producto tratado de célula transformada" significa, por ejemplo, una célula tratada con un agente tensioactivo o un disolvente orgánico, una célula secada, una célula rota, un extracto crudo de una célula y similares, así como los productos fijados mediante un medio conocido.

65 Particularmente, cuando se utiliza una célula transformada que contiene tanto un DNA que codifica el polipéptido del presente invento como un DNA que codifica un polipéptido que tiene capacidad para regenerar la coenzima, o un producto tratado de la misma, no es necesario preparar ni añadir separadamente una enzima para regenerar la coenzima, y se puede producir eficazmente un alcohol ópticamente activo.

## ES 2 317 277 T3

Al incorporar tanto el DNA que codifica el polipéptido del presente invento como el DNA que codifica un polipéptido que tiene capacidad para regenerar la coenzima en un único vector e introducir el vector en una célula huésped, o incorporar respectivamente estas dos clases de DNA en dos clases de vector pertenecientes a grupos incompatibles diferentes e introducir las dos clases de vector en una única célula huésped, se puede obtener una célula transformada que contenga tanto un DNA que codifica el polipéptido del presente invento como un DNA que codifica un polipéptido que tiene capacidad para regenerar la coenzima.

Los ejemplos del vector que lleva incorporados tanto un DNA que codifica el polipéptido del presente invento como un DNA que codifica un polipéptido que tiene capacidad para regenerar la coenzima incluyen pNTOM3G1, pNTOM4G1 y pNTOM5G1, vectores obtenidos al introducir un gen de glucosa deshidrogenasa procedente de *Bacillus megaterium* en cada uno de los vectores de expresión pNTOM3, pNTOM4 y pNTOM5 anteriormente mencionados, y similares. Los ejemplos de la célula transformada que contiene tanto el DNA que codifica el polipéptido del presente invento como el DNA que codifica un polipéptido que tiene capacidad para regenerar la coenzima incluyen *E. coli* HB101 (pNTOM3G1), *E. coli* HB101 (pNTOM4G1) y *E. coli* HB101 (pNTOM5G1), células obtenidas al transformar *E. coli* HB101 con estos vectores, y similares.

La actividad del polipéptido que tiene capacidad para regenerar la coenzima en una célula transformada se puede determinar mediante un método convencional. Por ejemplo, se puede calcular la actividad de la glucosa deshidrogenasa a partir del índice de aumento de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm cuando se añaden glucosa 100 mM, coenzima NADP o NAD 2 mM y la enzima a un tampón de Tris-HCl 1 M (pH de 8,0) y se deja reaccionar la mezcla a 25°C durante 1 minuto.

La célula transformada que contiene un DNA que codifica el polipéptido del presente invento puede ser cultivada en un medio nutritivo líquido convencional que contenga fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, nutrientes orgánicos y similares, con tal de que crezca.

El alcohol ópticamente activo que resulta de la reacción puede ser purificado mediante un método convencional. Por ejemplo, cuando el alcohol ópticamente activo que resulta de la reacción es (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, se somete la mezcla de reacción a extracción con un disolvente orgánico tal como acetato de etilo, tolueno o similar, y se evapora el disolvente orgánico bajo presión reducida. Además puede ser purificado mediante un tratamiento tal como precipitación de cristales, cromatografía o similar.

Para la cuantificación de la (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona y el (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, así como para la medición del exceso diastereomérico de (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, se puede usar una cromatografía de alta eficacia en fase líquida [columna: COSMOSIL 5C8-MS (4,6 mm de diámetro x 250 mm; fabricada por Nacalai Tesque); eluyente: disolución acuosa de ácido fosfórico 10 mM/acetonitrilo = 1/1; caudal: 1 ml/min; detección: 210 nm].

Como se mencionó anteriormente, de acuerdo con el presente invento, se puede producir eficazmente el polipéptido del presente invento y, utilizando el polipéptido, se puede obtener un método de producción superior para diversos alcoholes ópticamente activos útiles, incluyendo el (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol.

### Ejemplos

El presente invento se explica con detalle en los Ejemplos siguientes, los cuales no han de ser considerados restrictivos. El método operativo detallado y demás, relativos a la técnica de DNA recombinante usada en los Ejemplos siguientes, se describe en los libros siguientes: "Molecular Cloning", 2ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), y "Current Protocols in Molecular Biology" (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience).

#### Ejemplo 1

##### *Purificación del polipéptido*

De acuerdo con el método siguiente, de la cepa NBRC0975 de *Ogataea minuta* var. *minuta* se aisló y purificó un polipéptido que tenía una actividad para reducir asimétricamente (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona para producir (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol. A menos que se especifique otra cosa, la purificación fue llevada a cabo a 4°C.

Se determinó la actividad reductora sobre la (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona disolviendo el sustrato [(3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonil-amino-4-fenil-2-butanona] hasta una concentración final de 0,2 mM y la coenzima NADPH hasta una concentración final de 0,25 mM en un tampón de fosfato 100 mM (pH de 6,5) que contenía dimetilsulfóxido al 0,33% (volumen/volumen), añadiendo luego una disolución de la enzima cruda, dejando transcurrir la reacción a 30°C durante 1 minuto y calculando el índice de disminución de la absorbancia de la mezcla de reacción a una longitud de onda de 340 nm. 1 unidad era definida como la actividad para oxidar 1 micromol de NADPH hasta NADP en 1 minuto bajo las citadas condiciones de reacción.

## ES 2 317 277 T3

### *Cultivo del microorganismo*

Se preparó un medio líquido (18 l, pH de 6,5) que contenía 5% de glucosa, 0,5% de polipeptona, 0,1% de extracto de levadura, 0,1% de hidrogenofosfato dipotásico, 0,2% de dihidrogenofosfato potásico y 0,02% de sulfato magnésico heptahidratado en un fermentador de recipiente agitado de 30 l de capacidad (fabricado por B. E. Marubishi Co., Ltd.) y se esterilizó con vapor a 120°C durante 20 minutos.

En este medio se inocularon 180 ml de un medio de cultivo de la cepa NBRC0975 de *Ogataea minuta* var. *minuta*, precultivada en el mismo medio con antelación, y se cultivó la mezcla bajo las condiciones de agitación a 250 rpm, caudal de aire de 5,0 l normales/min y 28°C durante 48 horas.

### *Preparación de un extracto exento de células*

Las células fueron recogidas del medio de cultivo anteriormente mencionado mediante centrifugación y fueron lavadas con 2000 ml de tampón de Tris-HCl 10 mM (pH de 7,5) para obtener 907 g de las células de la cepa. Las células fueron suspendidas en 1800 ml de tampón de Tris-HCl 10 mM (pH de 7,5) que contenía ditioneitol (DTT) 0,1 mM y fueron rotas usando una máquina UH-600 para dispersión por ultrasonificación (fabricada por SMT). Los fragmentos celulares fueron separados por centrifugación del producto de ruptura para obtener un extracto exento de células.

### *Fraccionamiento con sulfato amónico*

Se ajustó el pH del extracto exento de células anteriormente obtenido a 7,5 con amoníaco acuoso, se añadió sulfato amónico y se disolvió hasta un 40% de saturación mientras se mantenía el pH, y se separó el precipitado resultante por centrifugación. Se añadió más sulfato amónico al sobrenadante y se disolvió hasta un 60% de saturación mientras se mantenía el pH en 7,5 del mismo modo que antes, y se recogió el precipitado resultante por centrifugación. Se disolvió el precipitado en un tampón de Tris-HCl 10 mM (pH de 7,5) que contenía DTT 0,1 mM y se dializó la disolución frente al mismo tampón durante la noche para obtener una fracción activa.

### *Cromatografía en columna de DEAE-Sephacel*

La fracción activa obtenida por fraccionamiento con sulfato amónico fue aplicada a una columna de DEAE-Sephacel (diámetro de 29 mm x 290 mm; fabricada por Amersham Biosciences), equilibrada de antemano con tampón de Tris-HCl 10 mM (pH de 7,5) que contenía DTT 0,1 mM, para permitir la adsorción de la fracción activa. Después del lavado de la columna con el mismo tampón, la fracción activa fue eluida con un gradiente lineal de cloruro sódico (de 0 M a 1 M). La fracción activa fue recogida y fue dializada durante la noche frente al mismo tampón.

### *Cromatografía en columna de MonoQ HR*

La fracción activa obtenida mediante cromatografía en columna de DEAE-Sephacel fue aplicada a una columna de MonoQ HR 10/10 (fabricada por Amersham Biosciences) equilibrada de antemano con tampón de Tris-HCl 10 mM (pH de 7,5) que contenía DTT 0,1 mM, para permitir la adsorción de la fracción activa. Después del lavado de la columna con el mismo tampón, la fracción activa fue eluida con un gradiente lineal de cloruro sódico (de 0 M a 1 M). La fracción activa fue recogida y fue dializada durante la noche frente al mismo tampón.

### *Cromatografía en columna de Phenyl-Superose*

Se disolvió cloruro sódico en la fracción activa obtenida mediante la cromatografía en columna de MonoQ HR hasta una concentración final de 4 M y se aplicó la disolución a una columna de Phenyl-Superose HR 10/10 (fabricada por Amersham Biosciences) equilibrada de antemano con tampón de Tris-HCl 10 mM (pH de 7,5) que contenía cloruro sódico 4 M y DTT 0,1 mM, para permitir la adsorción de la fracción activa. Después del lavado de la columna con el mismo tampón, la fracción activa se eluyó con un gradiente lineal de cloruro sódico (de 4 M a 0 M). Se recogió la fracción activa y se dializó durante la noche frente a un tampón de Tris-HCl 10 mM (pH de 7,5) que contenía DTT 0,1 mM.

### *Cromatografía en columna de MonoQ HR*

La fracción activa obtenida mediante la cromatografía en columna de Phenyl-Superose fue aplicada a una columna de MonoQ HR 5/5 (fabricada por Amersham Biosciences) equilibrada de antemano con tampón de Tris-HCl 10 mM (pH de 7,5) que contenía DTT 0,1 mM, para permitir la adsorción de la fracción activa. Después del lavado de la columna con el mismo tampón, la fracción activa fue eluida con un gradiente lineal de cloruro sódico (de 0 M a 1 M). La fracción activa fue recogida y fue concentrada utilizando Centricon YM-10 (fabricado por Millipore).

### *Cromatografía por filtración en gel*

La fracción activa obtenida mediante la susodicha cromatografía en columna de MonoQ HR fue aplicada a una columna de Superdex 200 HR 10/30 (fabricada por Amersham Biosciences) equilibrada de antemano con tampón de Tris-HCl 10 mM (pH de 7,5) que contenía cloruro sódico 0,2 M y DTT 0,1 mM, y se eluyó la fracción activa utilizando

## ES 2 317 277 T3

el mismo tampón con un caudal de 0,5 ml/min. La fracción activa fue recogida y fue concentrada utilizando Centricon YM-10 (fabricado por Millipore). El producto de concentración fue aplicado a una columna de Superdex 200 HR 10/30 (fabricada por Amersham Biosciences) equilibrada de antemano con el mismo tampón, y la fracción activa fue eluida utilizando el mismo tampón con un caudal de 0,5 ml/min. La fracción activa fue recogida y fue usada como una muestra estándar purificada del polipéptido.

### Ejemplo 2

#### Clonación génica

##### Preparación de cebadores para PCR

El polipéptido purificado obtenido en el Ejemplo 1 fue desnaturalizado en presencia de urea 8 M y fue sometido a digestión con una lisil endopeptidasa procedente de *Achromobacter* (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). A continuación, se determinó la secuencia de aminoácidos del fragmento peptídico obtenido mediante el secuenciador de proteínas ABI492 (fabricado por Perkin Elmer). Basándose en la secuencia de DNA prevista a partir de la secuencia de aminoácidos, se sintetizaron el cebador 1: 5'-acngntayttyathgcngg-3' (SEQ ID NO: 5) y el cebador 2: 5'-atnggdattrcraaytrtc-3' (SEQ ID NO: 6) para multiplicar por PCR una parte del gen que codifica el polipéptido.

##### Multiplicación génica por PCR

Se extrajo el DNA cromosómico de las células de la cepa NBRC0975 de *Ogataea minuta* var. *minuta*, cultivadas de la misma manera que en el Ejemplo 1 de acuerdo con el método de Visser [Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 415 (2000)] y similares. Utilizando los cebadores 1 y 2 de DNA anteriormente preparados y el DNA cromosómico obtenido como molde, se llevó a cabo la PCR. Como resultado, se multiplicó un fragmento de DNA de aproximadamente 700 pares de bases, considerado una parte del gen objetivo. La PCR fue llevada a cabo utilizando TaKaRa Ex Taq (fabricada por TAKARA BIO) como DNA polimerasa, siguiendo las condiciones de reacción del manual de instrucciones para la misma. Se clonó el fragmento de DNA en un plásmido pT7Blue T-Vector (fabricado por Novagen) y se analizó la secuencia de bases del mismo utilizando el kit ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (fabricado por Perkin Elmer) y el secuenciador de DNA ABI 373A (fabricado por Perkin Elmer). Como resultado de la PCR, se ha aclarado que se multiplicaron dos clases de fragmentos de DNA que tenían diferentes secuencias de bases. Las secuencias de bases de los mismos se muestran en la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8.

##### Identificación de la secuencia de longitud completa del gen objetivo por i-PCR

El DNA cromosómico de la cepa NBRC0975 de *Ogataea minuta* var. *minuta* anteriormente preparado fue completamente sometido a digestión con la enzima de restricción XbaI, y una mezcla de los fragmentos de DNA obtenidos fue sometida a ciclación intramolecular con ligasa de T4. Utilizando esto como molde, se determinó por i-PCR [Nucl. Acids Res. 16, 8186 (1988)] la secuencia de bases de longitud completa del gen que contiene la susodicha secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 7. Los resultados se muestran en la SEQ ID NO: 1. La i-PCR fue llevada a cabo usando TaKaRa LA Taq (fabricada por TAKARA BIO) como DNA polimerasa, siguiendo las condiciones de reacción del manual de instrucciones para la misma. También se determinó la secuencia de bases de longitud completa del gen que contiene la susodicha secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 8 mediante una operación similar, y los resultados de la misma se muestran en la SEQ ID NO: 2. Además, en la SEQ ID NO: 3 se muestra la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1 y, en la SEQ ID NO: 4, se muestra la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2.

### Ejemplo 3

#### Construcción de un vector de expresión

Se llevó a cabo una PCR utilizando el cebador 3: 5'-gtgcatatgaccaagactgtttattca-3' (SEQ ID NO: 9) y el cebador 4: 5'-gtcgaattcttataaaatggaatgctgaa-3' (SEQ ID NO: 10), y el DNA cromosómico de la cepa NBRC0975 de *Ogataea minuta* var. *minuta* obtenido en el Ejemplo 2 como molde. Como resultado, se obtuvo un DNA de doble cadena en el que se había añadido un sitio de reconocimiento para NdeI al codón de iniciación y se había añadido un sitio de reconocimiento para EcoRI inmediatamente detrás del codón de terminación de un gen que tiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2. La PCR se llevó a cabo utilizando TaKaRa LA Taq (fabricada por TAKARA BIO) como DNA polimerasa, siguiendo las condiciones de reacción del manual de instrucciones para la misma. Se sometió el DNA a digestión con NdeI y EcoRI y se insertó entre el sitio de reconocimiento para NdeI y el sitio de reconocimiento para EcoRI, cadena abajo del promotor lac del plásmido pUCNT (Documento WO94/03613), para construir el vector recombinante pNTOM4.

Similarmente, usando el cebador 5: 5'-gtgcatatggctaagactgtctattca-3' (SEQ ID NO: 11) y el cebador 6: 5'-gtcgaattcttactagaatggaatgctgaaa-3' (SEQ ID NO: 12), se obtuvo un DNA de doble cadena en el que se había añadido un sitio de reconocimiento para NdeI al codón de iniciación y se había añadido un sitio de reconocimiento para EcoRI inmediatamente detrás del codón de terminación de un gen que tiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1. El DNA se insertó en el plásmido pUCNT de la misma forma que antes para construir el vector recombinante pNTOM3.

## ES 2 317 277 T3

### Ejemplo 4

#### *Preparación de un gen mutante*

5 Utilizando Mutan-SuperExpress Km (fabricado por TAKARA BIO) y siguiendo el método operativo descrito en el manual de instrucciones del mismo, se preparó un gen mutante al sustituir la 125<sup>a</sup> C por G, sustituir la 128<sup>a</sup> A por C, sustituir la 136<sup>a</sup> A por G y sustituir la 147<sup>a</sup> C por G en el gen que tiene la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2. El gen mutante codifica un polipéptido en el que la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 tiene la 42<sup>a</sup> alanina sustituida por glicocola, el 43<sup>o</sup> ácido glutámico sustituido por alanina, la 46<sup>a</sup> lisina sustituida por ácido glutámico y la 49<sup>a</sup> asparagina sustituida por lisina. La secuencia de bases del gen mutante se muestra en la SEQ ID NO: 15 y la secuencia de aminoácidos del polipéptido mutante codificado por el gen se muestra en la SEQ ID NO: 16. El gen mutante se insertó en un vector pUCNT de la misma manera que en el Ejemplo 3 para construir el vector recombinante pNTOM5.

### 15 Ejemplo 5

#### *Construcción de un vector de expresión que contiene además el gen de la glucosa deshidrogenasa*

20 Utilizando el cebador 7: 5'-gccgaattctaaggagggttaacaatgtataaa-3' (SEQ ID NO: 13) y el cebador 8: 5'-gcggtcgacttatccgctcctgctgg-3' (SEQ ID NO: 14), y el plásmido pGDK1 [Eur. J. Biochem. 186, 389 (1989)] como molde, se llevó a cabo una PCR para obtener un DNA de doble cadena en el que, en un gen de glucosa deshidrogenasa (al que más adelante se hace referencia como GDH) procedente de la cepa IAM1030 de *Bacillus megaterium*, se había añadido una secuencia de unión al ribosoma de *Escherichia coli* 5 bases cadena arriba del codón de iniciación, se había añadido un punto de escisión para EcoRI inmediatamente antes de la secuencia de unión al ribosoma y se había añadido un punto de escisión para Sall inmediatamente detrás del codón de parada.

25 El fragmento de DNA obtenido fue sometido a digestión con EcoRI y Sall y fue insertado en los sitios EcoRI y Sall de pNTOM3, pNTOM4 y pNTOM5, construidos en los Ejemplos 3 y 4, para construir los plásmidos recombinantes pNTOM3G1, pNTOM4G1 y pNTOM5G1. Como un ejemplo, el método de producción y la estructura de pNTOM4G1 se muestran en la Figura 1.

### Ejemplo 6

#### *Preparación de una célula transformada*

35 Utilizando los vectores recombinantes pNTOM3, pNTOM4 y pNTOM5 construidos en los Ejemplos 3 y 4, se transformó la célula competente *E. coli* HB101 (fabricada por TAKARA BIO) para obtener *E. coli* HB101 (pNTOM3), *E. coli* HB101 (pNTOM4) y *E. coli* HB101 (pNTOM5). Estas células transformadas se han depositado bajo los números de acceso FERM BP-10368, FERM BP-10369 y FERM BP-10370, respectivamente, en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository (IPOD).

40 Similarmente, utilizando los vectores recombinantes pNTOM3G1, pNTOM4G1 y pNTOM5G1 construidos en el Ejemplo 5, se transformó la célula competente *E. coli* HB101 (fabricada por TAKARA BIO) para obtener *E. coli* HB101 (pNTOM3G1), *E. coli* HB101 (pNTOM4G1) y *E. coli* HB101 (pNTOM5G1).

### Ejemplo 7

#### *Expresión génica en la célula transformada*

50 Se inocularon seis clases de células transformadas obtenidas en el Ejemplo 6 y *E. coli* HB101 (pUCNT), que es una célula transformada que contiene un vector plasmídico pUCNT, en 50 ml de medio YT 2x (1,6% de triptona, 1,0% de extracto de levadura, 0,5% de NaCl, pH de 7,0) que contenía 200 µg/ml de ampicilina, y se realizó un cultivo con sacudimiento a 37°C durante 24 horas. Las células fueron recogidas por centrifugación y fueron suspendidas en 50 ml de tampón de fosfato 100 mM (pH de 6,5). Se rompieron las células con un homogeneizador UH-50 por ultrasonificación (fabricado por SMT) y se separaron los fragmentos celulares por centrifugación para obtener un extracto exento de células. Se midieron la actividad reductora de (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona y la actividad GDH del extracto exento de células, valores que se expresan en la Tabla 1 como actividad específica. Se observó expresión de actividad reductora de (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona en las 6 clases de células transformadas obtenidas en el Ejemplo 6. En *E. coli* HB101 (pNTOM3G1), *E. coli* HB101 (pNTOM4G1) y *E. coli* HB101 (pNTOM5G1), que contienen un gen GDH, también se observó expresión de la actividad GDH. La actividad reductora de (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona fue medida mediante el método descrito en el Ejemplo 1. La actividad GDH se calculó a partir del índice de aumento de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm cuando se añaden glucosa 0,1 M, coenzima NADP 2 mM y una disolución de enzima cruda a un tampón de Tris-HCl 1 M (pH de 8,0) y se deja reaccionar la mezcla a 25°C durante 1 minuto. 1 unidad era definida como la actividad enzimática para reducir 1 micromol de NADP hasta NADPH en 1 minuto bajo las citadas condiciones de reacción. Además, se midió la concentración de proteína en el extracto exento de células utilizando un kit para ensayo de proteínas (fabricado por BIO-RAD).

## ES 2 317 277 T3

TABLA 1

Cepa	Actividad reductora de CBPB* (U/mg)	Actividad GDH (U/mg)
<i>E. coli</i> HB101 (pUCNT)	0,0	0
<i>E. coli</i> HB101 (pNTOM3)	6,3	0
<i>E. coli</i> HB101 (pNTOM4)	5,0	0
<i>E. coli</i> HB101 (pNTOM5)	14,0	0
<i>E. coli</i> HB101 (pNTOM3G1)	5,7	119
<i>E. coli</i> HB101 (pNTOM4G1)	3,5	157
<i>E. coli</i> HB101 (pNTOM5G1)	9,0	122
CBPB*: (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona		

### Ejemplo 8

#### *Reacción usando una célula transformada*

Se añadieron 2000 U de glucosa deshidrogenasa (fabricada por Amano Enzyme), 2 g de glucosa, 6 mg de NADP y 2,5 g de (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona a 50 ml de un extracto de *E. coli* HB101 (pNTOM3) exento de células, preparado en el Ejemplo 7, y se agitó la mezcla a 30°C durante 22 horas mientras se ajustaba el pH a 6,5 mediante la adición, gota a gota, de una disolución 5 M de hidróxido sódico. Tras la compleción de la reacción, se sometió la mezcla de reacción a extracción con tolueno, se eliminó el disolvente y se analizó el extracto. Como resultado, se obtuvo (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol (86,3% de rendimiento, 96,4% de exceso diastereomérico).

Para la cuantificación de la (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona y el (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, así como para la medición del exceso diastereomérico de (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, se utilizó una cromatografía de alta eficacia en fase líquida [columna: COSMOSIL 5C8-MS (4,6 mm de diámetro x 250 mm; fabricada por Nacalai Tesque); eluyente: disolución acuosa de ácido fosfórico 10 mM/acetronitrilo = 1/1; caudal: 1 ml/min; detección: 210 nm].

### Ejemplo 9

#### *Reacción usando una célula transformada*

Se añadieron 1250 U de glucosa deshidrogenasa (fabricada por Amano Enzyme), 3 g de glucosa, 4 mg de NADP y 0,25 g de (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona a 22,5 ml de un extracto de *E. coli* HB101 (pNTOM4) exento de células, preparado en el Ejemplo 7, y se agitó la mezcla a 30°C mientras se ajustaba el pH a 6,5 mediante la adición, gota a gota, de una disolución 5 M de hidróxido sódico. Se añadió (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona (0,25 g) a las 2 h, 4 h y 6 h del inicio de la reacción, y se añadieron 1,25 g de la misma a las 8 h del inicio de la reacción, y se dejó reaccionar la mezcla durante 31 horas. Tras la compleción de la reacción, se sometió la mezcla de reacción a extracción con tolueno, se eliminó el disolvente y se analizó el extracto de la misma manera que en el Ejemplo 8. Como resultado, se obtuvo (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol (99,0% de rendimiento, 99,8% de exceso diastereomérico).

### Ejemplo 10

#### *Reacción usando una célula transformada*

Se añadieron 3 g de glucosa, 3 mg de NADP, 0,25 ml de tolueno y 2,5 g de (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona a 25 ml de un medio de cultivo de *E. coli* HB101 (pNTOM4G1) preparado de la misma manera que en el Ejemplo 7, y se agitó la mezcla a 30°C durante 40 horas mientras se ajustaba el pH a 6,5 mediante la adición, gota a gota, de una disolución 5 M de hidróxido sódico. Tras la compleción de la reacción, se sometió la mezcla de reacción a extracción con tolueno, se eliminó el disolvente y se analizó el extracto de la misma forma que

## ES 2 317 277 T3

en el Ejemplo 8. Como resultado, se obtuvo (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol (99,1% de rendimiento, 99,8% de exceso diastereomérico).

### 5 Ejemplo 11

#### *Reacción usando una célula transformada*

10 Se añadieron 6 g de glucosa, 1,4 mg de NADP, 0,25 ml de tolueno y 2,5 g de (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona a 50 ml de un medio de cultivo de *E. coli* HB101 (pNTOM5G1) preparado de la misma manera que en el Ejemplo 7, y se agitó la mezcla a 30°C mientras se ajustaba el pH a 6,5 mediante la adición, gota a gota, de una disolución 5 M de hidróxido sódico. Una hora después del inicio de la reacción, se añadieron 2,5 g de (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona y se dejó reaccionar la mezcla durante 20 h. Tras la compleción de la reacción, se sometió la mezcla de reacción a extracción con tolueno, se eliminó el disolvente y se analizó el extracto de la misma forma que en el Ejemplo 8. Como resultado, se obtuvo (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol (99,6% de rendimiento, 99,8% de exceso diastereomérico).

### 20 Ejemplo 12

#### *Especificidad de sustrato del polipéptido*

25 Se disolvieron un compuesto carbonílico, que iba a ser el sustrato, en una concentración final de 1 mM y la coenzima NADPH en una concentración final de 0,25 mM, respectivamente, en un tampón de fosfato 100 mM (pH de 6,5) que contenía dimetilsulfóxido al 0,33% (volumen/volumen). Se añadió un extracto de *E. coli* HB101 (pNTOM4) o *E. coli* HB101 (pNTOM3) exento de células, preparado en el Ejemplo 7, a la disolución y se dejó reaccionar la mezcla a 30°C durante 1 minuto. La actividad reductora sobre cada compuesto carbonílico se calculó a partir del índice de disminución de la absorbancia de la mezcla de reacción a una longitud de onda de 340 nm, mostrándose en la Tabla 2 como un valor relativo a la actividad sobre la (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona, que es 100%. Los dos polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, que fueron producidos por las células transformadas, mostraron actividad reductora sobre una gran variedad de compuestos carbonílicos.

35 TABLA 2

Especificidad de sustrato de los polipéptidos producidos por la célula transformada		
Sustrato (compuesto carbonílico)	Actividad relativa (%)	
	<i>E. coli</i> HB101	
	(pNTOM3)	(pNTOM4)
CBPB*	100	100
2-acetilpiridina	29	0
3-acetilpiridina	15	0
4-acetilpiridina	98	0



ES 2 317 277 T3

Especificidad de sustrato de los polipéptidos producidos por la célula transformada		
	Actividad relativa (%)	
	<i>E. coli</i> HB101	
Sustrato (compuesto carbonílico)	(pNTOM3)	(pNTOM4)
5		
10		
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 317 277 T3

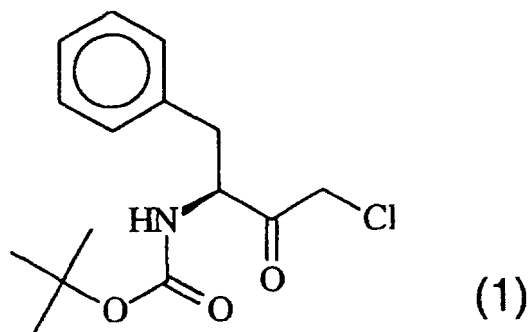
Especificidad de sustrato de los polipéptidos producidos por la célula transformada		
	Actividad relativa (%)	
	<i>E. coli</i> HB101	
Sustrato (compuesto carbonílico)	(pNTOM3)	(pNTOM4)
3-fenilpropionaldehído	2410	7
Glutaraldehído	80	1
CBPB*: (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona		

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

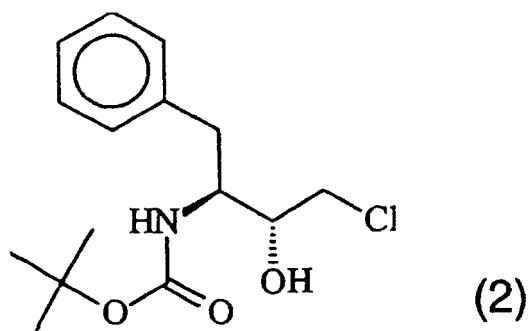
## REIVINDICACIONES

1. Un DNA del punto (a) o (b) siguiente:

- (a) un DNA que comprende la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1,
- (b) un DNA que se hibrida con un DNA que consiste en una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1 bajo condiciones rigurosas, y que codifica un polipéptido que tiene una actividad para reducir asimétricamente (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona, representada por la fórmula (1) siguiente:



para producir (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, representado por la fórmula (2) siguiente:



2. Un DNA del punto (a) o (b) siguiente:

- (a) un DNA que comprende la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2,
- (b) un DNA que se hibrida con un DNA que consiste en una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2 bajo condiciones rigurosas, y que codifica un polipéptido que tiene una actividad para reducir asimétricamente (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona, representada por la susodicha fórmula (1), para producir (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, representado por la susodicha fórmula (2).

3. El polipéptido codificado por el DNA de la reivindicación 1 ó 2 y que tiene una actividad para reducir asimétricamente (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona, representada por la susodicha fórmula (1), para producir (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, representado por la susodicha fórmula (2).

4. Un polipéptido del punto (a) o (b) siguiente:

- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3,
- (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra no menos de 78% de homología con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y que tiene una actividad para reducir asimétricamente (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona, representada por la susodicha fórmula (1), para producir (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, representado por la susodicha fórmula (2).

## ES 2 317 277 T3

5. Un polipéptido del punto (a) o (b) siguiente:

(a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4,

5 (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra no menos de 78% de homología con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y que tiene una actividad para reducir asimétricamente (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona, representada por la susodicha fórmula (1), para producir (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, representado por la susodicha fórmula (2).

10

6. Un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 salvo por al menos una mutación de los puntos 1) a 4) siguientes:

1) la 42ª alanina está sustituida por glicocola,

15

2) el 43º ácido glutámico está sustituido por alanina,

3) la 46ª lisina está sustituida por ácido glutámico,

20

4) la 49ª asparagina está sustituida por lisina.

7. El polipéptido de la reivindicación 6, que comprende todas las mutaciones 1) a 4).

25

8. Un DNA que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.

9. Un vector que comprende el DNA de la reivindicación 1, 2 u 8.

30

10. El vector de la reivindicación 9, en el que dicho vector es un plásmido, plásmido que es seleccionado del grupo que consiste en:

(a) el plásmido pNTOM3, que es obtenible de *E.coli* HB101 (pNTOM3) FERM BP-10368;

35

(b) el plásmido pNTOM4, que es obtenible de *E.coli* HB101 (pNTOM4) FERM BP-10369; y

(c) el plásmido pNTOM5, que es obtenible de *E.coli* HB101 (pNTOM5) FERM BP-10370.

40

11. El vector de la reivindicación 9, que comprende además un DNA que codifica un polipéptido que tiene una actividad glucosa deshidrogenasa.

12. El vector de la reivindicación 11, en el que el polipéptido que tiene una actividad glucosa deshidrogenasa es una glucosa deshidrogenasa procedente de *Bacillus megaterium*.

45

13. Una célula transformada obtenida al transformar una célula huésped con el vector de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.

14. La célula transformada de la reivindicación 13, en que la célula huésped es *Escherichia coli*.

50

15. La célula transformada de la reivindicación 14, en que dicha *E. coli* es seleccionada del grupo que consiste en:

(a) *E.coli* HB101 (pNTOM3) FERM BP-10368;

55

(b) *E.coli* HB101 (pNTOM4) FERM BP-10369; y

(c) *E.coli* HB101 (pNTOM5) FERM BP-10370.

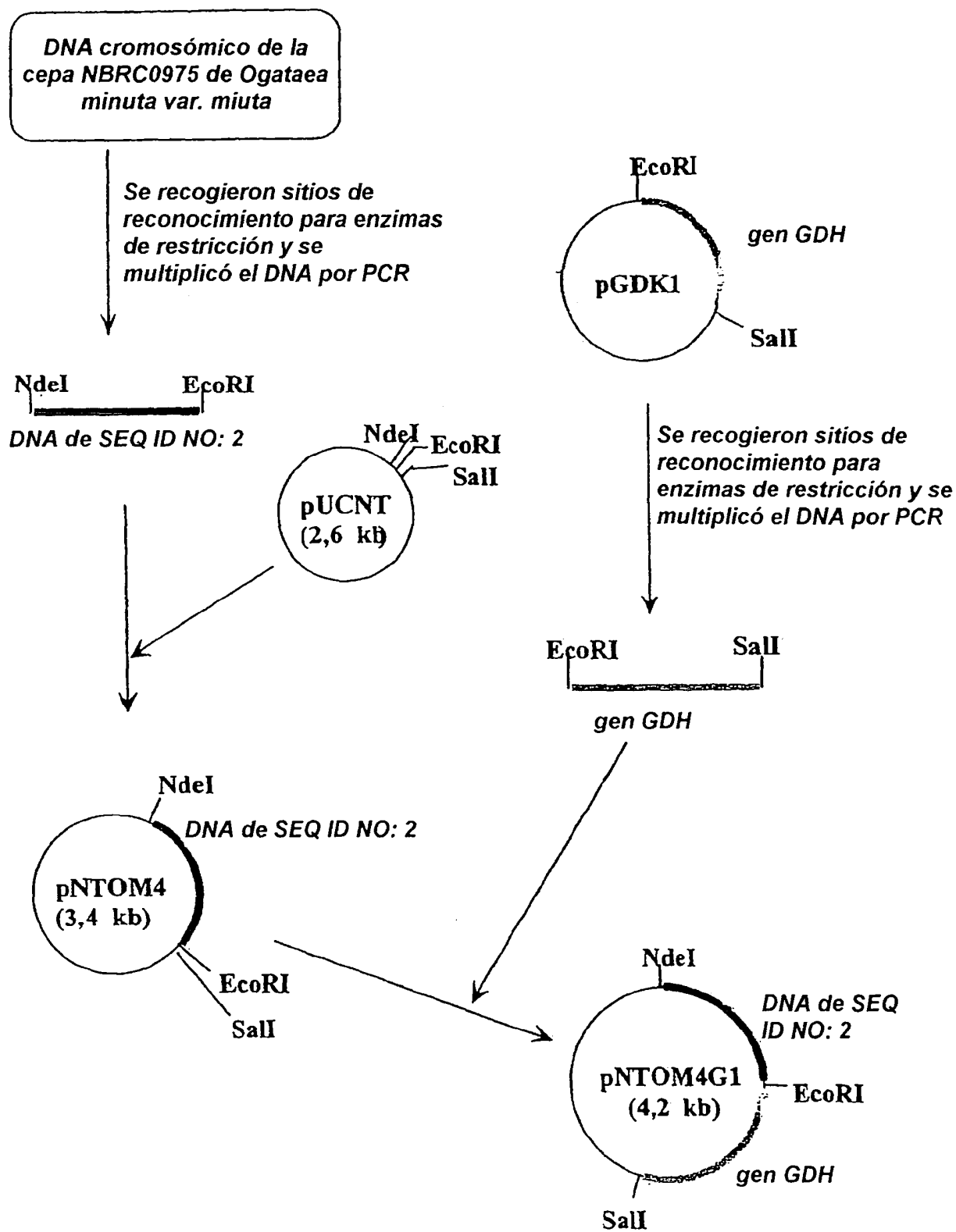
16. Un método para producir un alcohol ópticamente activo, que comprende hacer reaccionar el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 o la célula transformada de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, o un producto tratado de la misma, con un compuesto que tiene un grupo carbonilo.

60

17. El método de la reivindicación 16, en el que el compuesto que tiene un grupo carbonilo es (3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanona, representada por la susodicha fórmula (1), y el alcohol ópticamente activo es (2R,3S)-1-cloro-3-terc-butoxicarbonilamino-4-fenil-2-butanol, representado por la susodicha fórmula (2).

65

FIG. 1



# ES 2 317 277 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Kaneka Corporation

5 <120> NUEVA CARBONIL REDUCTASA, GEN DE LA MISMA Y MÉTODO PARA USAR LA MISMA

<130> B040342W001-

10 <150> JP2004-231226

<151> 2004-08-06

15 <160> 16

<170> PatentIn, versión 3.1

<210> 1

20 <211> 756

<212> DNA

<213> *Ogataea minuta* var. *minuta*

25 <400> 1

```
atggctaaga ctgtctatTT cattgccgga gcatcgagag ggattggcct cgagattgca 60
30 acccaattga .gtgcaaacc agagaacccat gtgattgcct cgtacagatc tgaaaagact 120
gctggTgcac tccTggaact tgccaagaag gacaacgtgg acaactgtgt gttggatatt 180
gcaatccagg agtcgatTga gggTttgtcc caacagattg tgaagctgac ggacggaatt 240
35 gatattgtcT tgatcaatgc cggagTtTga tactcaatgt actctctact cgaatgttcc 300
agagaagcat tcattgacca ctggactaca aattctctgg gtccaatcct ggtgtataag 360
gaaatccacc aattcatgct gaagagagaa actcgaaaag Tgttcttcat gtctagcgga 420
40 gcagggtcTt ttcagggccca ctTgcctgtt tccgtgagTg catacggTat gtcgaaggca 480
gcactgaact acgcgggccc gaaactTtct gacgaatgct acaaagacgg cTttactatt 540
45 gtggcgcttc acccaggtat ggttctgaca gacatgggta TggagagTat tgagattatg 600
gcaaaccggag acgagcagct Tgccgcgtcc atcaacagta Ttgcaattag tacagacact 660
agtgccgcac aatgcattgg Tgcaatgcag agTcttTcaa agcagagcaa cggtagattc 720
50 attaatgttg cagaccagTt Tgacattcca ttctag 756
```

<210> 2

55 <211> 756

<212> DNA

<213> *Ogataea minuta* var. *minuta*

60

65

## ES 2 317 277 T3

<400> 2

5	atgaccaaga ctgtttat	60
	ctt cttattggtt cttacagaac ggagaaaact	120
	gcagctgagc tgctcaaact ggccaacaaa gaaaatgtcg acaactgtgt cctagacatt	180
10	ggtagccaag gttctattga agcgcttcca gcacaaatct caaagctgac ggacggaatc	240
	gatattactc tgatcaatgc cggaattgcg tactcaatgt actctat	300
	agagagacat ttattgatca ctggaccaca aattccttgg gtccaatcat gctctacaag	360
15	gagattcatc agtticatgt gaagagagaa actcgttaagg tgttttcat gtctagtgga	420
	ggaggctcta tccagtctct attgcctatt tcaaccagtg cttacggtat gtcgaaggct	480
	gcactgaact atgcggtccg gaagctttct gatgaatgct acaaggacaa cttcaccatt	540
20	gtgatgttgc acccaggagt ggtggccacg gatatgggcc gggaaactac caagatcatg	600
	gccaatggaa atgctcagat tatctcttat attgaaicca tatctttgcc gcccgctaca	660
	agcgtgcac agactattgg tgcaatgcaa gctcttgaca agcagagcaa tggtaggttc	720
25	atcggagtcg cagaccagtt cgacattcca ttttaa	756

<210> 3

30 <211> 251

<212> PRT

<213> *Ogataea minuta* var. *minuta*

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 317 277 T3

<400> 3

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

Leu Glu Ile Ala Thr Gln Leu Ser Ala Asn Pro Glu Asn His Val Ile  
20 25 30

10 Ala Ser Tyr Arg Ser Glu Lys Thr Ala Gly Ala Leu Leu Glu Leu Ala  
35 40 45

15 Lys Lys Asp Asn Val Asp Thr Val Val Leu Asp Ile Ala Ile Gln Glu  
50 55 60

20 Ser Ile Glu Gly Leu Ser Gln Gln Ile Val Lys Leu Thr Asp Gly Ile  
65 70 75 80

Asp Ile Ala Leu Ile Asn Ala Gly Val Gly Tyr Ser Met Tyr Ser Leu  
85 90 95

25 Leu Glu Cys Ser Arg Glu Ala Phe Ile Asp His Trp Thr Thr Asn Ser  
100 105 110

30 Leu Gly Pro Ile Leu Val Tyr Lys Glu Ile His Gln Phe Met Leu Lys  
115 120 125

Arg Glu Thr Arg Lys Val Phe Phe Met Ser Ser Gly Ala Gly Ser Ile  
130 135 140

35 Gln Gly His Leu Pro Val Ser Val Ser Ala Tyr Gly Met Ser Lys Ala  
145 150 155 160

40 Ala Leu Asn Tyr Ala Ala Arg Lys Leu Ser Asp Glu Cys Tyr Lys Asp  
165 170 175

Gly Phe Thr Ile Val Ala Leu His Pro Gly Met Val Leu Thr Asp Met  
180 185 190

45 Gly Met Glu Ser Ile Glu Ile Met Ala Asn Gly Asp Glu Gln Leu Ala  
195 200 205

50 Ala Ser Ile Asn Ser Ile Ala Ile Ser Thr Asp Thr Ser Ala Ala Gln  
210 215 220

55 Cys Ile Gly Ala Met Gln Ser Leu Thr Lys Gln Ser Asn Gly Arg Phe  
225 230 235 240

Ile Asn Val Ala Asp Gln Phe Asp Ile Pro Phe  
245 250

60

<210> 4

<211> 251

<212> PRT

65

<213> *Ogataea minuta* var. *minuta*

ES 2 317 277 T3

<400> 4

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

Leu Glu Val Ala Thr Gln Leu Ser Ala Asn Pro Asp Asn Tyr Val Ile  
 20 25 30

Gly Ser Tyr Arg Thr Glu Lys Thr Ala Ala Glu Leu Leu Lys Leu Ala  
 35 40 45

Asn Lys Glu Asn Val Asp Thr Val Val Leu Asp Ile Gly Ser Gln Gly  
 50 55 60

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

Asp Ile Thr Leu Ile Asn Ala Gly Ile Ala Tyr Ser Met Tyr Ser Ile  
 85 90 95

Phe Glu Cys Ser Arg Glu Thr Phe Ile Asp His Trp Thr Thr Asn Ser  
 100 105 110

Leu Gly Pro Ile Met Leu Tyr Lys Glu Ile His Gln Phe Met Leu Lys  
 115 120 125

Arg Glu Thr Arg Lys Val Phe Phe Met Ser Ser Gly Gly Gly Ser Ile  
 130 135 140

Gln Ser Leu Leu Pro Ile Ser Thr Ser Ala Tyr Gly Met Ser Lys Ala  
 145 150 155 160

Ala Leu Asn Tyr Ala Val Arg Lys Leu Ser Asp Glu Cys Tyr Lys Asp  
 165 170 175

Asn Phe Thr Ile Val Met Leu His Pro Gly Val Val Ala Thr Asp Met  
 180 185 190

Gly Arg Glu Thr Thr Lys Ile Met Ala Asn Gly Asn Ala Gln Ile Ile  
 195 200 205

Ser Tyr Ile Glu Ser Ile Ser Leu Pro Pro Ala Thr Ser Ala Ala Gln  
 210 215 220

Thr Ile Gly Ala Met Gln Ala Leu Asp Lys Gln Ser Asn Gly Arg Phe  
 225 230 235 240

Ile Gly Val Ala Asp Gln Phe Asp Ile Pro Phe  
 245 250

60 <210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

65

<220>

<223> Cebador 1

## ES 2 317 277 T3

- <220>  
<221> característica varia  
<222> (3)..(3)  
5 <223> n representa a, t, g o c
- <220>  
<221> característica varia  
10 <222> (6)..(6)  
<223> n representa a, t, g o c
- <220>  
15 <221> característica varia  
<222> (18)..(18)  
<223> n representa a, t, g o c
- 20 <400> 5
- acngtntayt tyathgcngg 20
- 25 <210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
30 <213> Artificial
- <220>  
<223> Cebador 2  
35
- <220>  
<221> característica varia  
40 <222> (3)..(3)  
<223> n representa a, t, g o c
- <400> 6
- 45 atnggdatrt craaytgrtc 20
- <210> 7  
50 <211> 703  
<212> DNA  
<213> *Ogataea minuta* var. *minuta*
- 55
- 60
- 65

ES 2 317 277 T3

<400> 7

5 agcatcgaga gggattggcc tcgagattgc aaccacaattg agtgcaaacc cagagaacca 60  
 10 tgtgattgcc tcgtacagat ctgaaaagac tgcctgggca ctcttggaac ttgccaagaa 120  
 15 ggacaacgtg gacactgttg tgttggatat tgcaatccag gactcgattg agggtttgtc 180  
 20 ccaacagatt gtgaagctga cggacggaat tgatattgct ctgatcaatg ccggagttgg 240  
 25 atactcaatg tactctctac tcgaatgttc cagagaagca ttcattgacc actggactac 300  
 30 aaattctctg ggtccaatcc tgggtatataa ggaaatccac caattcatgc tgaagagaga 360  
 35 aactcgaaaa gtgttcttca tgtctagcgg agcagggtct attcagggcc acttgccctgt 420  
 40 ttccgtagt gcatacggta tgtcgaaggc agcactgaac tacgaggccc ggaaactttc 480  
 45 tgacgaatgc tacaagacg gctttactat tgtggcgctt caccaggtta tggttctgac 540  
 50 agacatgggt atggagagta ttgagattat ggcaaaccga gacgagcagc ttccgcgctc 600  
 55 catcaacagt attgcaatta gtacagacac tagtgccgca caatgcattg gtgcaatgca 660  
 60 gactcttaca aagcagagca acggtagatt cattaatgtt gca 703

<210> 8

<211> 703

<212> DNA

<213> *Ogataea minuta* var. *minuta*

<400> 8

35 agcttctaga ggtattggcc ttgaggttgc cactcagctg agtgccaacc cagataatta 60  
 40 tgttatttgt tottacagaa cggagaaaac tgcagctgag ctgctcaaac tggccaacaa 120  
 45 agaaaaatgc gacactgttg tcctagacat tggtagccaa ggttctattg aagcgcttcc 180  
 50 agcacaatc tcaaagctga cggacggaat cgatattact ctgatcaatg ccggaattgc 240  
 55 gtactcaatg tactctatct tcgagtgttc cagagagaca ttattgatc actggaccac 300  
 60 aaattccttg ggtccaatca tgctctacaa ggagattcat cagttcatgc tgaagagaga 360  
 65 aactcgtaag gtgttttca tgtctagtagg aggaggctct atccagctc tattgcctat 420  
 70 ttcaaccagt gcttacggta tgtcgaaggc tgcaactgaac tatgcggtcc ggaagcttcc 480  
 75 tgatgaatgc tacaaggaca acttcacat tgtgatgttg caccagggag tggtagggccac 540  
 80 ggatatgggc cgggaaacta ccaagatcat ggccaatgga aatgctcaga ttatctctta 600  
 85 tattgaatcc atatctttgc cggccgctac aagcgtgca cagactattg gtgcaatgca 660  
 90 agctcttgac aagcagagca atggtaggtt catcggagtc gca 703

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

65 <220>

<223> Cebador 3

# ES 2 317 277 T3

<400> 9

gtgcatatga ccaagactgt ttattca 28

5 <210> 10

<211> 30

<212> DNA

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador 4

15 <400> 10

gtcgaattct tattaaatg gaatgctgaa 30

20 <210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

25 <220>

<223> Cebador 5

30 <400> 11

gtgcatatgg ctaagactgt ctattca 28

<210> 12

35 <211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

40 <220>

<223> Cebador 6

<400> 12

45 gtcgaattct tactagaatg gaatgtcaaa 30

<210> 13

50 <211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

55 <220>

<223> Cebador 7

<400> 13

60 gccgaattct aaggaggta acaatgtata aa 32

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

65 <213> Artificial

ES 2 317 277 T3

<220>

<223> Cebador 8

5 <400> 14

gcggtcgact tatccgctg ctgcttgg 28

10 <210> 15

<211> 756

<212> DNA

15 <213> Artificial

<220>

<223> DNA mutante 1

20 <400> 15

25 atgaccaaga ctgtttattt cattgccgga gcttctagag gtattggcct tgaggttgcc 60  
actcagctga gtgcccaacc agataattat gttattgggt cttacagaac ggagaaaact 120  
gcagggtggc tgctcgaact ggccaagaaa gaaaatgtcg acaactgttg cctagacatt 180  
ggtagccaag gttctattga agcgcttcca gcacaaatct caaagctgac ggacggaatc 240  
30 gatattactc tgatcaatgc cgggaattgc tactcaatgt actctatatt cgagtggtcc 300  
agagagacat ttattgatca ctggaccaca aattccttgg gtccaatcat gctctacaag 360  
gagattcadc agttcatgct gaagagagaa actcgttaagg tgtttttcat gtctagtgga 420  
35 ggaggctcta tccagtctct attgcctatt tcaaccagtg cttacggatg gtcgaaggct 480  
gcactgaaact atcgggtccg gaagctttct gatgaatgct acaaggacaa cttcaccatt 540  
40 gtgatgttgc acccaggagt ggtggccacg gatatgggccc gggaaactac caagatcatg 600  
gccaatggaa atgctcagat tatctcttat attgaatcca tatctttgcc gcccgctaca 660  
agcgtgacac agactattgg tgcaatgcaa gctcttgaca agcagagcaa tggtaggttc 720  
45 atcggagtcg cagaccagtt cgacattcca ttttaa 756

<210> 16

50 <211> 251

<212> PRT

<213> Artificial

55 <220>

<223> Polipéptido mutante 1

60

65

ES 2 317 277 T3

<400> 16

5 Met Thr Lys Thr Val Tyr Phe Ile Ala Gly Ala Ser Arg Gly Ile Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Glu Val Ala Thr Gln Leu Ser Ala Asn Pro Asp Asn Tyr Val Ile  
 20 25 30  
 10 Gly Ser Tyr Arg Thr Glu Lys Thr Ala Gly Ala Leu Leu Glu Leu Ala  
 35 40 45  
 Lys Lys Glu Asn Val Asp Thr Val Val Leu Asp Ile Gly Ser Gln Gly  
 50 55 60  
 15 Ser Ile Glu Ala Leu Pro Ala Gln Ile Ser Lys Leu Thr Asp Gly Ile  
 65 70 75 80  
 20 Asp Ile Thr Leu Ile Asn Ala Gly Ile Ala Tyr Ser Met Tyr Ser Ile  
 85 90 95  
 Phe Glu Cys Ser Arg Glu Thr Phe Ile Asp His Trp Thr Thr Asn Ser  
 100 105 110  
 25 Leu Gly Pro Ile Met Leu Tyr Lys Glu Ile His Gln Phe Met Leu Lys  
 115 120 125  
 30 Arg Glu Thr Arg Lys Val Phe Phe Met Ser Ser Gly Gly Gly Ser Ile  
 130 135 140  
 35 Gln Ser Leu Leu Pro Ile Ser Thr Ser Ala Tyr Gly Met Ser Lys Ala  
 145 150 155 160  
 40 Ala Leu Asn Tyr Ala Val Arg Lys Leu Ser Asp Glu Cys Tyr Lys Asp  
 165 170 175  
 Asn Phe Thr Ile Val Met Leu His Pro Gly Val Val Ala Thr Asp Met  
 180 185 190  
 45 Gly Arg Glu Thr Thr Lys Ile Met Ala Asn Gly Asn Ala Gln Ile Ile  
 195 200 205  
 50 Ser Tyr Ile Glu Ser Ile Ser Leu Pro Pro Ala Thr Ser Ala Ala Gln  
 210 215 220  
 Thr Ile Gly Ala Met Gln Ala Leu Asp Lys Gln Ser Asn Gly Arg Phe  
 225 230 235 240  
 55 Ile Gly Val Ala Asp Gln Phe Asp Ile Pro Phe  
 245 250  
 60  
 65