

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 962 530**

51 Int. Cl.:

C07D 405/06 (2006.01)
C07D 471/20 (2006.01)
C07D 209/12 (2006.01)
C07D 209/14 (2006.01)
C07D 209/34 (2006.01)
C12P 17/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2013** **E 19182727 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2023** **EP 3578557**

54 Título: **Proceso químico para la preparación de espiroindolonas e intermedios de las mismas**

30 Prioridad:

23.03.2012 WO PCT/CN2012/000359

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
19.03.2024

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

CROWE, MICHAEL;
FOULKES, MICHAEL;
FRANCESE, GIANCARLO;
GRIMLER, DOMINIQUE;
KUESTERS, ERNST;
LAUMEN, KURT;
LI, YUNZHONG;
LIN, CHANGXUE;
NAZOR, JOVANA;
RUCH, THOMAS;
SMITH, DEREK;
SONG, SHIWEI y
TENG, SHANGJUN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 962 530 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

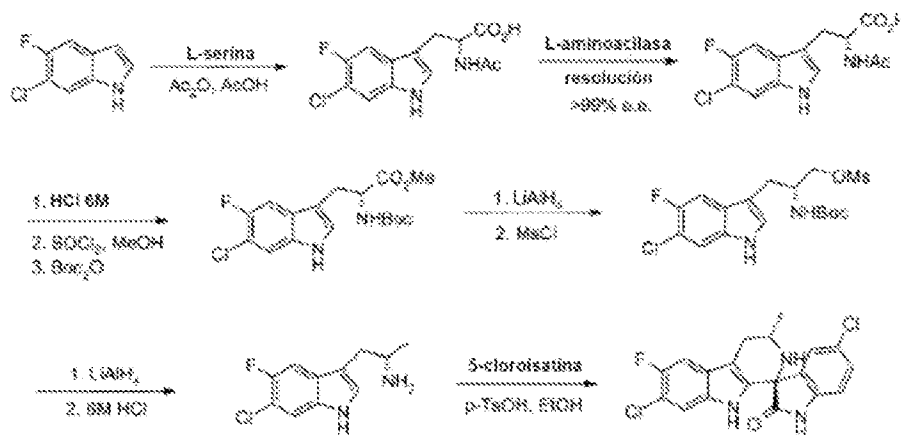
Proceso químico para la preparación de espiroindolonas e intermedios de las mismas

Referencia al listado de secuencias, tabla o programa informático

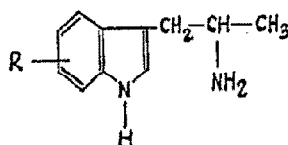
La copia oficial del Listado de Secuencias se envía simultáneamente con la especificación como un archivo de texto con formato ASCII a través de EFS-Web, con un nombre de archivo "PAT055051_seq12.txt", una fecha de creación del 22 de marzo de 2013 y un tamaño de 447 kilobytes. El Listado de Secuencias presentado a través de EFS-Web es parte de la especificación.

Técnica anterior:

Se conoce (1'R,3'S)-5,7'-dicloro-6'-fluoro-3'-metil-2',3',4',9'-tetrahidroespiro[indolina-3,1'-pirido[3,4-b]indolj-2-ona (por ejemplo, un compuesto de fórmula (IV), que comprende una fracción de espiroindolona) y un método sintético de 6 etapas para preparación, que incluye el compuesto intermedio de amina quiral (IIA) conocido (documento WO 2009/132921):

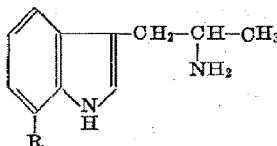


El documento GB 974 895 A describe un proceso para la producción de compuestos de triptamina que en forma de base libre tienen la fórmula,



y sales de adición de ácidos de los mismos, donde R representa un grupo alquilo inferior que contiene de 1 a 3 átomos de carbono.

El documento US 3 282 959 describe compuestos de triptamina que en forma de base libre tienen la fórmula



donde R representa metilo, metoxi o cloro, así como sales de adición de los mismos; y procesos para la producción de los mismos.

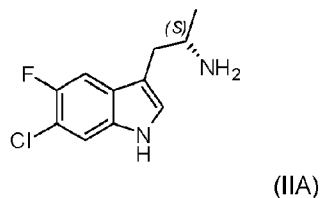
D.E. Nichols et al., J. Med. Chem., 1988, 31(7), páginas 1406-1412 describe un procedimiento para la preparación de α -metiltryptaminas (AMT) ópticamente puras a partir de indoles sustituidos.

Invención:

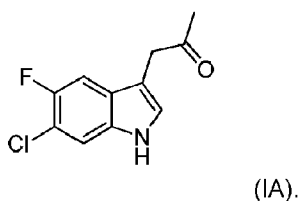
La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se dirige a intermediarios utilizados en un método mejorado para sintetizar compuestos de espiroindolona, en particular, (1'R,3'S)-5,7'-dicloro-6'-fluoro-3'-metil-2',3',4',9'-tetrahidroespiro[indolina-3,1'-pirido[3,4-b]indol]-2-ona.

- 5 Un compuesto de la invención se puede utilizar en un proceso para preparar un compuesto de fórmula (IIA) o una sal o hidrato o solvato del mismo.

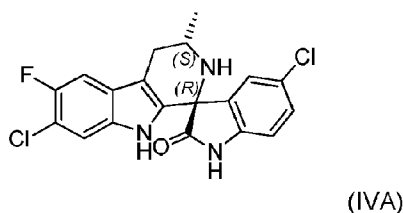


- 10 que comprende transaminar enzimáticamente un compuesto de fórmula (IA) o una sal o solvato o hidrato del mismo,

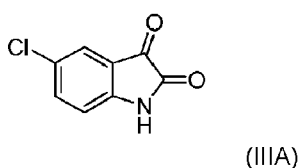


para proporcionar el compuesto de fórmula (IIA).

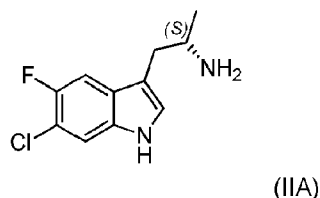
- 15 Un compuesto de la invención se puede utilizar en un proceso para preparar un compuesto de fórmula (IVA), o una sal o solvato o hidrato del mismo.



- 20 que comprende: hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IIIA) o una sal o solvato o hidrato del mismo,

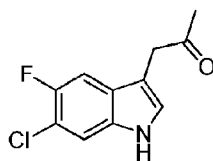


- 25 con un compuesto de fórmula (II) o una sal o solvato o hidrato del mismo,

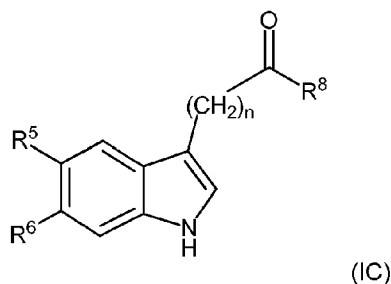


para proporcionar el compuesto de fórmula (IVA), o una sal o solvato o hidrato del mismo,

- 30 en el que el compuesto de fórmula (IIA) se prepara a partir del compuesto de fórmula (IA), o una sal o hidrato o solvato del mismo,

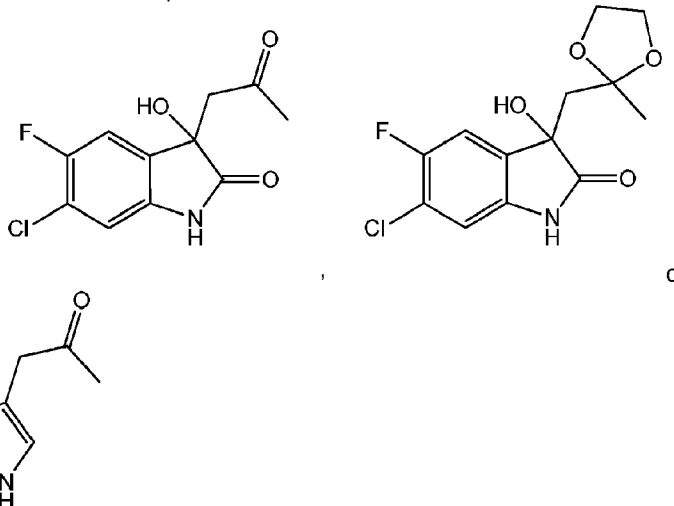


En una realización, la invención es un compuesto de fórmula (IC):



R⁵ y R⁶ son cada uno, independientemente halo, hidroxilo, alquilo (C₁-C₆), trihalo alquilo (C₁), ciano o alcoxi (C₁-C₆); R⁸ es alquilo (C₁-C₆), opcionalmente sustituido con un hidroxilo; n es 1 o 2; o una sal o hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización la invención es un compuesto seleccionado de:



o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

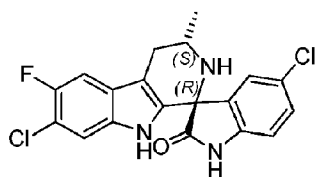
Campo de la invención

La invención se refiere a un nuevo intermedio útil para la preparación de compuestos de espiroindolona útiles para el tratamiento de enfermedades parasitarias que comprenden, por ejemplo, una fracción de espiroindolona, tal como (1'R,3'S)-5,7'-dicloro-6'-fluoro-3'-metil-2',3',4',9'-tetrahidroespiro[indolina-3,1'-pirido[3,4-b]indol]-2-ona.

Antecedentes de la invención

La presente invención es útil en procesos para la preparación de compuestos de espiroindolona, tales como (1'R,3'S)-5,7'-dicloro-6'-fluoro-3'-metil-2',3',4',9'-tetrahidroespiro[indolina-3,1'-pirido[3,4-b]indol]-2-ona.

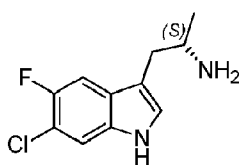
(1'R,3'S)-5,7'-dicloro-6'-fluoro-3'-metil-2',3',4',9'-tetrahidroespiro[indolina-3,1'-pirido[3,4-b]indol]-2-ona es útil en el tratamiento y/o prevención de infecciones tales como aquellas causadas por Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale, Trypanosoma cruzi y parásitos del género Leishmania tales como, por ejemplo, Leishmania donovani, y tiene la siguiente estructura:



(IVA)

(1'R,3'S)-5,7'-dicloro-6'-fluoro-3'-metil-2',3',4',9'-tetrahidroespiro[indolina-3,1'pirido[3,4-b]indol]-2-ona y una síntesis de la misma se describen en el documento WO 2009/132921 A1 en particular en el Ejemplo 49 del mismo.

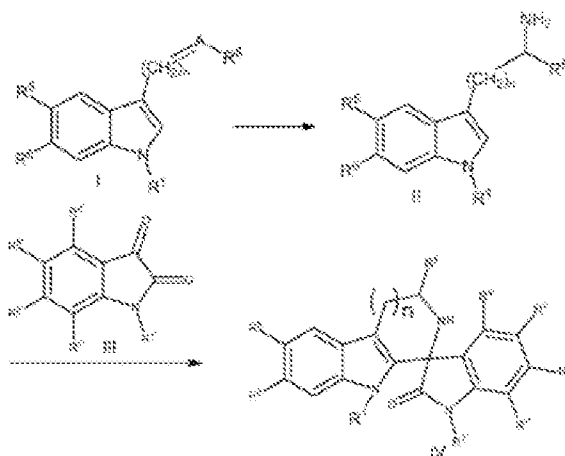
Es necesario proporcionar un nuevo proceso para la preparación de (1'R,3'S)-5,7'-dicloro-6'-fluoro-3'-metil-2',3',4',9'-tetrahidroespiro[indolina-3,1'pirido[3,4-b]indol]-2-ona con el fin de mejorar la eficiencia general de la síntesis para que sea adecuada para la fabricación. En particular, subsiste la necesidad de aumentar la eficiencia de la síntesis del intermedio de amina quiral (IIA):



(IIA).

Descripción detallada de la invención

El(los) proceso(s) para producir compuestos de espiroindolona, tales como los compuestos de acuerdo con la fórmula (IV), o sal o hidrato o solvato de los mismos, e intermedios, tal como se definen en el presente documento, se resumen en el Esquema 1.

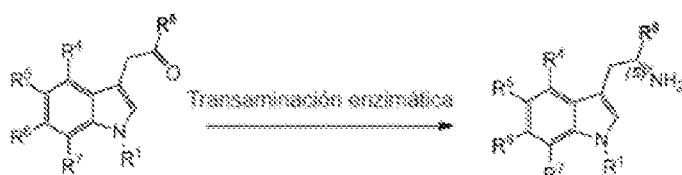


Esquema 1

A saber, un compuesto de fórmula (I), o una sal o hidrato o solvato del mismo, se convierte en un compuesto de fórmula (II), o una sal o hidrato o solvato del mismo, de acuerdo con los métodos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 en los que

- el método 1 comprende

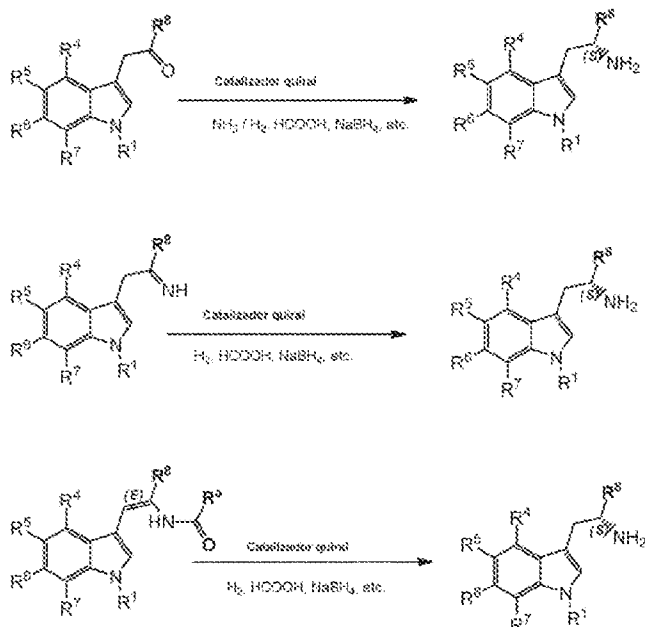
a) Transaminación enzimática para convertir un compuesto de fórmula (I), o una sal o hidrato o solvato del mismo, en un compuesto de fórmula (II), o una sal o hidrato o solvato del mismo.



- el método 2 comprende;

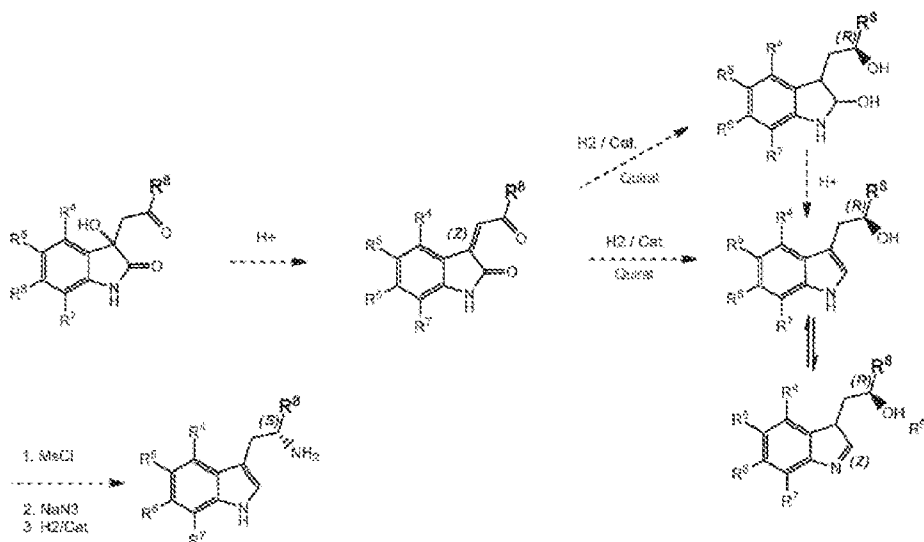
a) Catálisis química asimétrica para convertir un compuesto de fórmula (I), o una sal o hidrato o solvato del mismo, en un compuesto de fórmula (II), o sal del mismo;

5



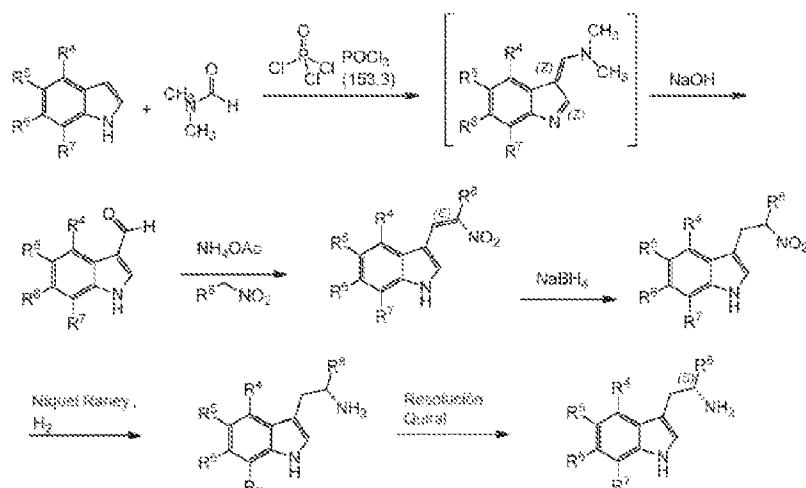
- el método 3 comprende

10 a) Reducción asimétrica química para convertir un compuesto de fórmula (I), o una sal o hidrato o solvato del mismo, en un compuesto de fórmula (II), o una sal o hidrato o solvato del mismo;



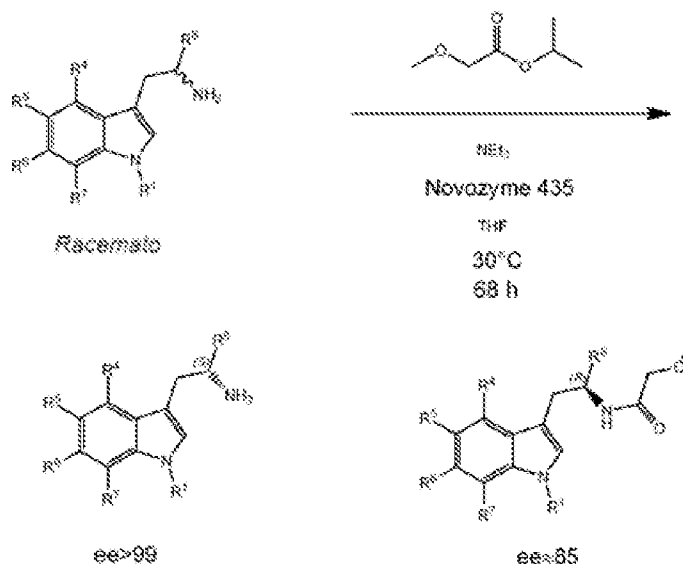
15 - el método 4 comprende

a) Reducción seguida de resolución quiral para convertir un compuesto de fórmula (I), o una sal o hidrato o solvato del mismo, en un compuesto de fórmula (II), o una sal o hidrato o solvato del mismo;



- el método 5 comprende

- 5 a) Resolución de lipasa para convertir un racemato de un compuesto de fórmula (II), o una sal o hidrato o solvato del mismo, en un compuesto de enantiómero único de fórmula (II), o una sal o hidrato o solvato del mismo;



- 10 Novozym 435: Lipasa B Candida antarctica inmovilizada sobre una resina acrílica.

- el método 6 comprende

- 15 a) Una combinación de dos o más de los métodos 1-5 para convertir un compuesto de fórmula (I), o una sal o hidrato o solvato del mismo, en un compuesto de fórmula (II), o una sal o hidrato o solvato del mismo.

Un compuesto de fórmula (II), o una sal del mismo, se puede convertir en un compuesto de fórmula (IV), o una sal del mismo, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2009/132921 en particular como se describe en las reivindicaciones y ejemplos relevantes.

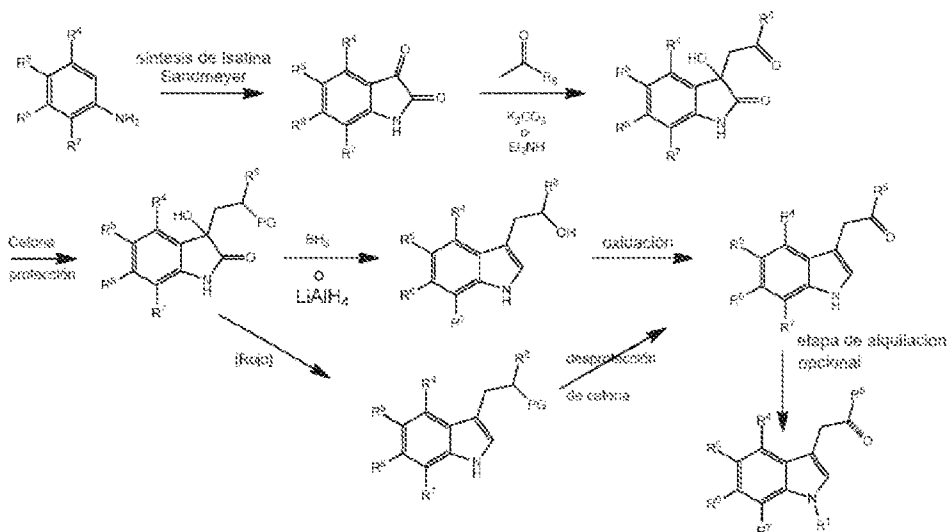
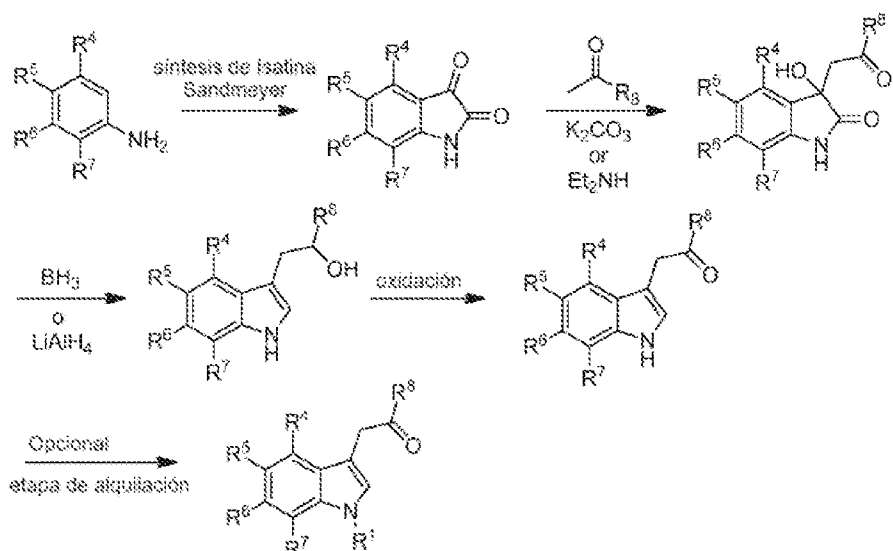
20 La invención se refiere a nuevos materiales de partida, como se definen en las reivindicaciones, que se han desarrollado específicamente para la preparación de los compuestos de acuerdo con la invención, a su uso y a procesos para su preparación.

25 La invención también se refiere a productos intermedios tal como se definen en las reivindicaciones que se han desarrollado específicamente para la preparación de los compuestos de acuerdo con la invención, a su uso y a procesos para su preparación.

Cabe señalar que en la presente solicitud usualmente las explicaciones realizadas en una sección también son aplicables a otras secciones, a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, las explicaciones para el residuo R¹ en la fórmula (I) dada en la sección A también se aplican si la fórmula (I) aparece en otras secciones, tal como la Sección B, a menos que se indique lo contrario.

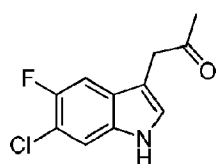
Sección a: Preparación de un compuesto de fórmula (I)

Un compuesto de fórmula (I), o una sal del mismo, o hidrato o solvato del mismo, se puede preparar como se describe a continuación y/o de acuerdo con los Ejemplos 1-3 contenidos en el presente documento.



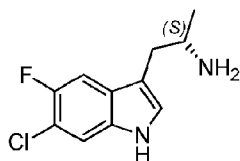
Sección B: Conversión de un compuesto de fórmula (I) en un compuesto de fórmula (II).

Un compuesto de la invención se puede utilizar en un proceso para convertir un compuesto de fórmula (I) en un compuesto de fórmula (II), en el que, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (IA) o una sal o hidrato o solvato del mismo,



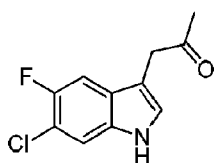
(IA).

Un compuesto de la invención se puede utilizar en un proceso para preparar un compuesto de fórmula (IIA) o una sal o hidrato o solvato del mismo.



(IIA)

5 que comprende transaminar enzimáticamente un compuesto de fórmula (IA) o una sal o solvato o hidrato del mismo,



(IA).

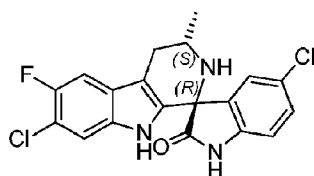
10 para proporcionar el compuesto de fórmula (IIA).

Normalmente, la cetona, compuesto (I), se disuelve en un solvente orgánico, por ejemplo, glicol, y se agrega a una mezcla acuosa de HCl de isopropilamina y piridoxalfosfato, seguido por la adición de tampón TEA. Luego se ajusta el pH a neutro con una base apropiada, por ejemplo, NaOH seguido de calentamiento y adición de transaminasa. La reacción se deja agitar a temperatura durante aproximadamente 24 horas. El producto de amina quiral sólida (compuesto de fórmula (II))) se aísla por medios conocidos por un experto en la técnica y/o de acuerdo con los Ejemplos 10-12.

La enzima puede ser la SEQ ID NO: 134.

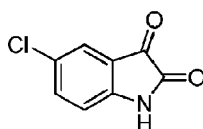
Sección C: Conversión de un compuesto de fórmula (II) en un compuesto de fórmula (IV)

Un compuesto de la invención se puede utilizar en un proceso para preparar un compuesto de fórmula (IVA), o una sal o solvato o hidrato del mismo.



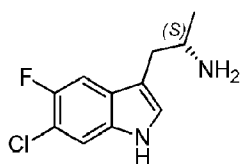
(IVA)

que comprende: hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IIIA) o una sal o solvato o hidrato del mismo,



(IIIA)

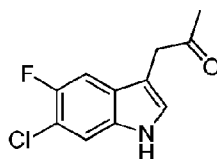
con un compuesto de fórmula (II) o una sal o solvato o hidrato del mismo,



(IIA)

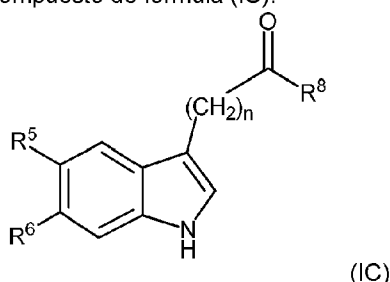
para proporcionar el compuesto de fórmula (IVA), o una sal o solvato o hidrato del mismo,

en el que el compuesto de fórmula (IIA) se prepara a partir del compuesto de fórmula (IA), o una sal o hidrato o solvato del mismo,



Sección D: Uso de los compuestos novedosos e inventivos de fórmula (IC).

En una realización, la invención es un compuesto de fórmula (IC):



en la que: R⁵ y R⁶ son cada uno, independientemente halo, hidroxilo, alquilo (C₁-C₆), trihalo alquilo (C₁), ciano o alcoxi (C₁-C₆); R⁸ es alquilo (C₁-C₆), opcionalmente sustituido con un hidroxilo; n es 1 o 2; o una sal o hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización alternativa, la invención es un compuesto de fórmula (IC) en la que, R⁵ y R⁶ son fluoro cuando: R⁸ es -CH₃, y n es 1.

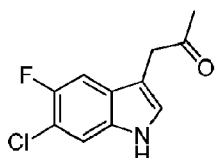
En una realización alternativa, la invención es un compuesto de fórmula (IC) en la que, R⁵ y R⁶ son fluoro y cloro, cuando: R⁸ es -CH₃, y n es 1.

En una realización alternativa, la invención es un compuesto de fórmula (IC) en la que, R⁵ y R⁶ son hidrógeno cuando: R⁸ es -CH₃ y n es 1.

En una realización alternativa, la invención es un compuesto de fórmula (IC) en la que, R⁵ es fluoro cuando: n es 1, y R⁶ es hidrógeno.

En una realización alternativa, la invención es un compuesto de fórmula (IC) en la que, R⁵ es H, -OH, -CH₃, -OCH₃, -F, -Cl, -CF₃ o -CN; R⁶ es H, -OH, -OCH₃, -F o -Cl; R⁸ es H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂OH, -CO₂H, -CO₂CH₃, -CO₂CH₂CH₃ o -CF₃; y n es 1 o 2.

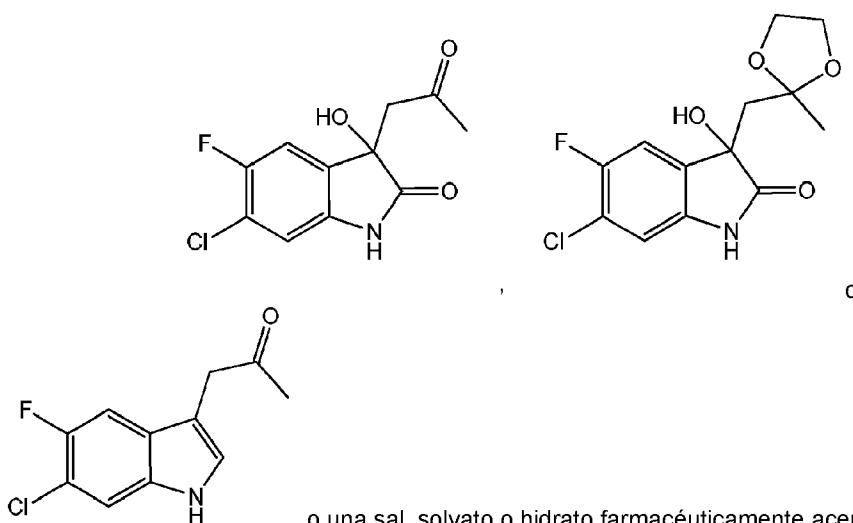
En una realización alternativa, la invención es un compuesto de fórmula (I) en la que, el compuesto es de la fórmula (IA):



(IA);

o una sal o hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización la invención es un compuesto seleccionado de:



Sección I: Términos generales

A continuación se enumeran definiciones de varios términos utilizadas para describir los intermedios novedosos y etapas sintéticas descritos en el presente documento. Estas definiciones, ya sea al reemplazar una, más de una o todas las expresiones o símbolos generales utilizados en la presente divulgación y proporcionar de esta manera las realizaciones de la invención, se aplican en particular a los términos tal como se utilizan en toda la especificación a menos que se definan de otra manera en casos específicos, ya sea individualmente o como parte de un grupo más grande. Por lo tanto, las definiciones generales utilizadas anteriormente y a continuación, a menos que se definan de manera diferente, tienen los siguientes significados:

El término "C₁-C₂₀-" define una fracción con hasta y que incluye como máximo 20, especialmente hasta y que incluye como máximo 7 átomos de carbono, dicha fracción es de cadena ramificada (una o más veces) o lineal y se une a través de un carbono terminal o no terminal.

Alquilo, que es un radical o parte de un radical, es una cadena de carbono lineal o ramificada (una o, si se desea y es posible, más veces), y es especialmente alquilo C₁-C₇, tal como alquilo C₁-C₄, en particular alquilo C₁-C₄ ramificado, tal como isopropilo. El término "inferior" o "C₁-C₇-" define una fracción con hasta y que incluye como máximo 7, especialmente hasta y que incluye como máximo 4 átomos de carbono, dicha fracción es de cadena ramificada (una o más veces) o lineal y se une a través de un carbono terminal o no terminal. Alquilo C₁-C₇ o inferior, por ejemplo, es n-pentilo, n-hexilo o n-heptilo o preferiblemente alquilo C₁-C₄, especialmente como metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, en particular metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo; preferiblemente metilo.

Alquilamino y dialquilamino se refieren a alquil-NH- y (alquil)₂N-, respectivamente, en los que alquilo puede ser lineal o ramificado. El grupo alquilo comprende, por ejemplo, de 1 a 7 y en particular de 1 a 4 átomos de C. Algunos ejemplos son metilamino, dimetilamino, etilamino y dietilamino; preferiblemente metilamino.

Halo o halógeno es preferiblemente flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente flúor o cloro; en donde se menciona halo como sustituyente, cuando sea posible, pueden estar presentes uno o más (por ejemplo, hasta tres o uno) átomos de halógeno, por ejemplo en halo-alquilo C₁-C₇, tal como trifluorometilo, 2,2-difluoroetilo o 2,2,2-trifluoroetilo.

Halo-alquilo C₁-C₇ puede ser lineal o ramificado y en particular comprende de 1 a 4 átomos de C, por ejemplo 1 ó 2 átomos de C. Ejemplos son fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, 2-cloroetilo y 2,2,2-trifluoroetilo; preferiblemente trifluorometilo.

Alcoxi, que es un radical o parte de un radical, se refiere a alquil-O-, en el que el término alquilo es como se define en el presente documento, e incluye, por ejemplo, alcoxi C₁-C₂₀ (-O-alquilo C₁-C₂₀), preferiblemente alcoxi C₁-C₇ (-O-alquilo C₁-C₇). En particular, alcoxi incluye, por ejemplo, radicales metoxi, etoxi, n-propiloxi, isopropiloxi, n-butiloxi, isobutiloxi, sec-butiloxi, tert-butiloxi, pentiloxi, hexiloxi y heptiloxi; preferiblemente metoxi.

El término "base ópticamente activa" describe, por ejemplo, aminas quirales, preferiblemente aminas terciarias quirales, más preferiblemente alcaloides de quina, tales como quinidina y quinina, lo más preferiblemente alcaloides de quina modificados. Ejemplos de tales alcaloides de quina modificados se detallan, por ejemplo, en Tian, S.-K.; Chen, Y.; Hang, J.; Tang, L.; McDiad, P.; Deng, L. Acc. Chem. Res. 2004, 37, 621-631 y referencias citadas en el mismo.

El término "catalizador de transferencia de fase" como se utiliza en el presente documento se refiere a una cantidad catalítica de un agente químico que potencia la tasa de una reacción entre especies químicas ubicadas en diferentes fases (por ejemplo, líquidos inmiscibles o sólido y líquido) al extraer uno de los reactivos, más comúnmente un anión, a través de la interfaz hacia la otra fase. Estos catalizadores incluyen sales de amonio cuaternario o fosfonio (por ejemplo, sales de tetraalquilamonio, en las que el alquilo puede ser igual o diferente), o agentes que forman complejos con cationes inorgánicos (por ejemplo, éteres corona u otros criptandos). El catión del catalizador no se consume en la reacción aunque sí se produce un intercambio aniónico. En particular, los catalizadores de transferencia de fase adecuados que se van a utilizar son sales de amonio cuaternario, por ejemplo de fórmula $R_mR_nR_lR_kNX$, en la que $R_mR_nR_lR_k$ son, iguales o diferentes, alquilo, y X es halo (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro) o hidróxido, por ejemplo, hidróxido de tetra-n-butilamonio.

Un catalizador "heterogéneo" como se utiliza en el presente documento se refiere a un catalizador soportado sobre un portador, normalmente, aunque no necesariamente, un sustrato compuesto de un material inorgánico, por ejemplo, un material poroso tal como carbono, silicio y/u óxido de aluminio.

Un catalizador "homogéneo" como se utiliza en el presente documento se refiere a un catalizador que no está soportado sobre un portador.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponerse a su compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles a su compañero de imagen especular.

El término "catalizador" significa cualquier sustancia que afecta la tasa de una reacción química al reducir la energía de activación de la reacción química.

El término "catalizador en polvo" significa un catalizador con un contenido de agua desde 0 hasta 30 % en masa.

El término "relación de sustrato a catalizador" (S/C) se refiere a la relación molar de los compuestos de partida, o sales de los mismos, al "catalizador de metal de transición".

El término "tratamiento final" significa el trabajo de aislamiento y/o purificación que se lleva a cabo una vez finalizada la reacción.

Como se utiliza en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario, el término "temperatura de la habitación" o "temperatura ambiente" significa una temperatura desde 15 hasta 30 °C, tal como desde 20 hasta 30 °C, tal como desde 20 hasta 25 °C.

El término "inerte", como se utiliza en esta solicitud, significa no reactivo con cualquiera de los reactivos, solventes u otros componentes de la mezcla de reacción. Dichas condiciones inertes generalmente se logran al utilizar gases inertes como dióxido de carbono, helio, nitrógeno, argón, entre otros gases.

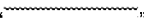
Los enlaces con el asterisco (*) denotan el punto de unión al resto de la molécula.

Los compuestos de la presente invención pueden poseer uno o más centros asimétricos. Las configuraciones absolutas preferidas son las indicadas específicamente en el presente documento. Sin embargo, la presente invención abarca cualquier posible enantiómero puro, diastereoisómero puro o mezclas de los mismos, por ejemplo, mezclas de enantiómeros, tales como racematos.

En las fórmulas de la presente solicitud el término ""

, "" o "-" sobre un C-sp³ representa un enlace covalente en el que la estereoquímica del enlace no se define. Esto significa que el término "" o "-" sobre un C-sp³ comprende una configuración (S) así como una configuración (R) del respectivo centro quiral. Además, también se abarcan las mezclas, por ejemplo, la presente invención abarca mezclas de enantiómeros, tales como racematos.

En las fórmulas de la presente solicitud el término "" o "" sobre C-sp² representa un enlace covalente, en el que la estereoquímica o la geometría del enlace no están definidas. Esto significa que el término "" sobre C-sp² comprende una configuración cis (Z), así como una configuración trans (E) del respectivo doble enlace. Además, también se abarcan mezclas, por ejemplo, la presente invención abarca mezclas de isómeros de doble enlace.

En las fórmulas de la presente solicitud, el término "" indica un enlace Csp³-Csp³ o un enlace Csp²-Csp².

Los compuestos de la presente invención pueden poseer uno o más centros asimétricos. Las configuraciones absolutas preferidas son las indicadas específicamente en el presente documento.

En las fórmulas de la presente solicitud el término “” sobre C-sp³ indica la estereoquímica absoluta, ya sea (R) o (S).

5 En las fórmulas de la presente solicitud el término “” sobre C-sp³ indica la estereoquímica absoluta, ya sea (R) o (S).

El término “pureza estereomérica” en un porcentaje dado significa que el estereoisómero designado predomina en ese porcentaje dado en una mezcla de estereoisómeros.

10 El término “estereoisómero” significa una de las configuraciones absolutas de una única molécula orgánica que tiene al menos un carbono asimétrico. Dentro de la definición de estereoisómero se incluyen enantiómeros y diastereómeros.

El término “resolución” se refiere a la separación, concentración o agotamiento de uno de los estereoisómeros de una molécula.

15 Las sales son sales especialmente farmacéuticamente aceptables o generalmente sales de cualquiera de los intermedios mencionados en el presente documento, donde las sales no se excluyen por razones químicas que el experto entenderá fácilmente. Se pueden formar cuando están presentes grupos formadores de sales, tales como grupos básicos o ácidos, que pueden existir en forma disociada al menos parcialmente, por ejemplo, en un rango de
20 pH desde 4 hasta 10 en soluciones acuosas, o se pueden aislar especialmente en forma sólida, especialmente cristalina.

Dichas sales se forman, por ejemplo, como sales de adición de ácidos, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, a partir de compuestos o cualquiera de los intermedios mencionados en el presente documento con un
25 átomo de nitrógeno básico (por ejemplo, imino o amino), especialmente las sales farmacéuticamente aceptables. Ácidos inorgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos de halógenos, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico. Ácidos orgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos carboxílicos, fosfónicos, sulfónicos o sulfámicos, por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido cítrico, aminoácidos como ácido glutámico o ácido aspártico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido benzoico, ácido
30 metano o etanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 1,5-naftaleno-disulfónico, ácido N-ciclohexilsulfámico, ácido N-metil-, N-etil- o N-propilsulfámico, u otros ácidos protónicos orgánicos, tales como ácido ascórbico.

En presencia de radicales cargados negativamente, tales como carboxi o sulfo, también se pueden formar sales con bases, por ejemplo sales de metal o de amonio, tales como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, por ejemplo sales de sodio, potasio, magnesio o calcio, o sales de amonio con amoniaco o aminas orgánicas adecuadas, por ejemplo trietilamina o tri(2-hidroxietil)amina, N-etil-piperidina, N,N'-dimetilpiperazina, t-butilamina, n-butilamina, feniletilamina, dicitlohexilamina o ciclohexilamina.

40 Cuando un grupo básico y un grupo ácido están presentes en la misma molécula, cualquiera de los intermedios mencionados en el presente documento también puede formar sales internas.

Para fines de aislamiento o purificación de cualquiera de los intermedios mencionados en el presente documento también es posible utilizar sales farmacéuticamente inaceptables, por ejemplo picratos o percloratos.

45 Las formas de sales preferidas incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácidos. Los compuestos que tienen al menos un grupo ácido (por ejemplo, COOH o 5-tetrazolilo) también pueden formar sales con bases. Sales con bases adecuadas son, por ejemplo, sales de metales, tales como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio o magnesio, o sales con amoniaco o una amina orgánica, tales como morfolina, tiomorfolina, piperidina, pirrolidina, una mono-, di- o trialquilamina inferior, por ejemplo, etil-, tert-butil-, dietil-, diisopropil-, trietil-, tributil- o dimetilpropilamina, o una mono-, di- o trihidroxi-alquilamina inferior, por ejemplo, mono-, di- o trietanolamina. Además se pueden formar las correspondientes sales internas. También se incluyen sales que no son adecuadas para usos farmacéuticos pero que se pueden emplear, por ejemplo, para el aislamiento o purificación de compuestos l libres o sus sales farmacéuticamente aceptables.

55 Como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un polipéptido” incluye más de un polipéptido.

60 De manera similar, “comprenden”, “comprende”, “que comprende”, “incluyen”, “incluye” y “que incluye” son intercambiables y no pretenden ser limitativos.

Se debe entender además que cuando las descripciones de diversas realizaciones utilizan el término “que comprende”, los expertos en la técnica entenderán que en algunos casos específicos, una realización puede describirse
65 alternativamente utilizando el lenguaje “que consiste esencialmente en” o “que consiste en”.

Se debe entender que tanto la descripción general anterior, que incluye los dibujos, como la siguiente descripción detallada son solo de ejemplo y explicativos y no limitan esta divulgación.

- 5 Los encabezados de las secciones utilizados en el presente documento tienen únicamente fines organizativos y no se deben interpretar como limitativos de la materia objeto descrita.

Las abreviaturas utilizadas para los aminoácidos codificados genéticamente son convencionales y son las siguientes:

Aminoácidos	Tres letras	Abreviatura de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptópano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

- 10 Cuando se utilizan abreviaturas de tres letras, a menos que estén precedidas específicamente por una "L" o una "D" o que queden claras del contexto en el que se utiliza la abreviatura, el aminoácido puede estar en la configuración L o D alrededor del carbono α (C_α). Por ejemplo, mientras que "Ala" designa alanina sin especificar la configuración del carbono α , "D-Ala" y "L-Ala" designan D-alanina y L-alanina, respectivamente. Cuando se utilizan abreviaturas de una letra, las letras mayúsculas designan aminoácidos en la configuración L alrededor del carbono α y las letras minúsculas designan aminoácidos en la configuración D alrededor del carbono α . Por ejemplo, "A" designa L-alanina y "a" designa D-alanina. Cuando las secuencias de polipéptidos se presentan como una cadena de abreviaturas de una o tres letras (o mezclas de las mismas), las secuencias se presentan en la dirección amino (N) a carboxi (C) de acuerdo con la convención común.

- 20 Las abreviaturas utilizadas para los nucleósidos que codifican genéticamente son convencionales y son las siguientes: adenosina (A); guanosina (G); citidina (C); timidina (T); y uridina (U). A menos que se delineen específicamente, los nucleótidos abreviados pueden ser ribonucleósidos o 2'-desoxirribonucleósidos. Los nucleósidos se pueden especificar como ribonucleósidos o 2'-desoxirribonucleósidos de forma individual o agregada. Cuando las secuencias de ácidos nucleicos se presentan como una cadena de abreviaturas de una letra, las secuencias se presentan en la dirección 5' a 3' de acuerdo con la convención común y no se indican los fosfatos.

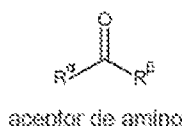
- 25 En referencia a la presente divulgación, los términos técnicos y científicos utilizados en las descripciones del presente documento tendrán los significados comúnmente entendidos por un experto con conocimientos básicos en la técnica, a menos que se defina específicamente lo contrario. De acuerdo con lo anterior, se pretende que los siguientes términos tengan los siguientes significados:

- 30 "Proteína", "polipéptido" y "péptido" se utilizan indistintamente en el presente documento para indicar un polímero de al menos dos aminoácidos ligados covalentemente por un enlace amida, independientemente de la longitud o la modificación postraduccional (por ejemplo, glicosilación, fosforilación, lipidación, miristilación, ubiquitinación, etc.). Dentro de esta definición se incluyen D- y L-aminoácidos, y mezclas de D- y L-aminoácidos.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico" se refiere a dos o más nucleósidos que están ligados covalentemente entre sí. El polinucleótido puede estar compuesto completamente por ribonucleósidos (es decir, un ARN), compuesto completamente por 2' desoxirribonucleótidos (es decir, un ADN) o mezclas de ribo- y 2' desoxirribonucleósidos. Si bien los nucleósidos normalmente se unirán entre sí mediante ligamientos fosfodiéster estándar, los polinucleótidos pueden incluir uno o más ligamientos no estándar. El polinucleótido puede ser monocatenario o bicatenario, o puede incluir tanto regiones de cadena sencilla como regiones de cadena doble. Más aún, aunque un polinucleótido normalmente estará compuesto por nucleobases codificantes de origen natural (es decir, adenina, guanina, uracilo, timina y citosina), puede incluir una o más nucleobases modificadas y/o sintéticas, tales como, por ejemplo, inosina, xantina, hipoxantina, etc. Preferiblemente, dichas nucleobases modificadas o sintéticas codificarán nucleobases.

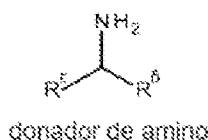
"Aminotransferasa" y "transaminasa" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polipéptido que tiene una capacidad enzimática de transferir un grupo amino (NH_2) desde una amina primaria a un grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) de una molécula aceptora. Las transaminasas como se utilizan en el presente documento incluyen transaminasas de origen natural (de tipo silvestre), así como polipéptidos modificados por ingeniería no naturales generados por manipulación humana.

"Aceptor de amino" y "aceptor de amina", "sustrato ceto", "ceto" y "cetona" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un compuesto carbonílico (ceto o cetona) que acepta un grupo amino desde una amina donador. En algunas realizaciones, los aceptores de amino son moléculas de la siguiente fórmula general,



en la que cada uno de R^α y R^β , cuando se toman independientemente, es un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, que se pueden sustituir o no sustituir con uno o más grupos enzimáticamente aceptables. R^α puede ser igual o diferente de R^β en estructura o quiralidad. En algunas realizaciones, R^α y R^β , tomados en conjunto, pueden formar un anillo no sustituido, sustituido o fusionado con otros anillos. Los aceptores de amino incluyen ácidos cetocarboxílicos y alcanonas (cetonas). Los ácidos cetocarboxílicos típicos son ácidos α -cetocarboxílicos tales como ácido glioxálico, ácido pirúvico, ácido oxaloacético y similares, así como sales de estos ácidos. Los aceptores de amino también incluyen sustancias que se convierten en un aceptor de amino mediante otras enzimas o procesos celulares completos, tales como el ácido fumárico (que se puede convertir en ácido oxaloacético, glucosa (que se puede convertir en piruvato), lactato, ácido maleico y otros. Los aceptores de amino que se pueden utilizar incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, 3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ona, 1-fenilbutan-2-ona, 3,3-dimetilbutan-2-ona, octan-2-ona, 3-oxobutanoato de etilo, 4-fenilbutan-2-ona, 1-(4-bromofenil)etanona, 2-metil-ciclohexanona, 7-metoxi-2-tetralona, 1-hidroxibutan-2-ona, ácido pirúvico, acetofenona, 3'-hidroxiacetofenona, 2-metoxi-5-fluoroacetofenona, ácido levulínico, 1-fenilpropan-1-ona, 1-(4-bromofenil)propan-1-ona, 1-(4-nitrofenil)propan-1-ona, 1-fenilpropan-2-ona, ácido 2-oxo-3-metilbutanoico, 1-(3-trifluorometilfenil)propan-1-ona, hidroxipropanona, metoxioxipropanona, 1-fenilbutan-1-ona, 1-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)butan-2-ona, 1-(4-hidroxifenil)butan-3-ona, 2-acetilnaftaleno, ácido fenilpirúvico, ácido 2-cetoglutarico y ácido 2-cetosuccínico, que incluye los isómeros tanto (R) como (S) únicos cuando sea posible.

"Donador de amino" o "donador de amina" se refiere a un compuesto amino que dona un grupo amino al aceptor de amino, convirtiéndose así en una especie carbonilo. En algunas realizaciones, los donadores de amino son moléculas de la siguiente fórmula general,



en la que cada uno de R^ϵ y R^δ , cuando se toman independientemente, es un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, que está sustituido o no sustituido con uno o más grupos enzimáticamente no inhibidores. R^ϵ puede ser igual o diferente en estructura o quiralidad. En algunas realizaciones, R^ϵ y R^δ , tomados en conjunto, pueden formar un anillo no sustituido, sustituido o fusionado con otros anillos. Los donadores de aminoácidos típicos que se pueden utilizar incluyen aminoácidos quirales y aquirales, y aminas quirales y aquirales. Los donadores de amino que se pueden utilizar incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, isopropilamina (también denominada 2-aminopropano), α -fenetilamina (también denominada 1-feniletanamina) y sus enantiómeros (S)-1-feniletanamina y (R)-1-feniletanamina, 2-amino-4-fenilbutano, glicina, ácido L-glutámico, L-glutamato, glutamato monosódico, L-alanina, D-alanina, D,L-alanina, ácido L-aspartico, L-lisina, D,L-ornitina, β -alanina, taurina, n-octilamina, ciclohexilamina, 1,4-butanodiamina (también conocida como putrescina), 1,6-hexanodiamina, ácido 6-aminohexanoico, ácido 4-aminobutírico, tiramina y bencilamina, 2-aminobutano, 2-amino-1-butanol, 1-amino-1-feniletano, 1-amino-1-(2-metoxi-5-fluorofenil)etano, 1-amino-1-fenilpropano, 1-amino-1-(4-hidroxifenil)propano, 1-amino-1-(4-bromofenil)propano, 1-amino-1-(4-nitrofenil)propano, 1-fenil-2-aminopropano, 1-(3-trifluorometilfenil)-2-aminopropano, 2-aminopropanol, 1-

amino-1-fenilbutano, 1-fenil-2-aminobutano, 1-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)-2-aminobutano, 1-fenil-3-aminobutano, 1-(4-hidroxifenil)-3-aminobutano, 1-amino-2-metilciclopentano, 1-amino-3-metilciclopentano, 1-amino-2-metilciclohexano, 1-amino-1-(2-naftil)etano, 3-metilciclopentilamina, 2-metilciclopentilamina, 2-etilciclopentilamina, 2-metilciclohexilamina, 3-metilciclohexilamina, 1-aminotetralina, 2-aminotetralina, 2-amino-5-metoxitetralina y 1-aminoindano, que incluyen los isómeros únicos tanto (R) como (S) cuando sea posible y que incluye todas las sales posibles de las aminas.

"Amina quiral" se refiere a aminas de fórmula general $R^1-CH(NH_2)-R^1$ y se emplea en el presente documento en su sentido más amplio, que incluye una amplia variedad de compuestos alifáticos y alicíclicos de tipos funcionales diferentes y mixtos, caracterizados por la presencia de un grupo amino primario unido a un átomo de carbono secundario que, además de un átomo de hidrógeno, lleva (i) un grupo divalente que forma una estructura cíclica quiral, o (ii) dos sustituyentes (distintos del hidrógeno) que difieren entre sí en estructura o quiralidad. Los grupos divalentes que forman una estructura cíclica quiral incluyen, por ejemplo, 2-metilbutano-1,4-diilo, pentano-1,4-diilo, hexano-1,4-diilo, hexano-1,5-diilo, 2-metilpentano-1,5-diilo. Los dos sustituyentes diferentes en el átomo de carbono secundario (R^1 y R^2 arriba) también pueden variar ampliamente e incluyen alquilo, aralquilo, arilo, halo, hidroxi, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquiltio inferior, cicloalquilo, carboxi, carbalcoxi, carbamoilo, carbamoilo mono y di-(alquilo inferior) sustituido, trifluorometilo, fenilo, nitro, amino, amino mono- y di-(alquilo inferior) sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilcarboxamido, arilcarboxamido, etc., así como alquilo, aralquilo o arilo sustituido por los anteriores.

"Piridoxal-fosfato", "PLP", "piridoxal-5'-fosfato", "PYP" y "P5P" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse al compuesto que actúa como coenzima en reacciones de transaminasas. En algunas realizaciones, se puede producir el fosfato de piridoxal se define por la estructura del ácido 1-(4'-formil-3'-hidroxi-2'-metil-5'-piridil)metoxifosfónico, número CAS [54-47-7], piridoxal-5'-fosfato in vivo por fosforilación y oxidación del piridoxol (también conocido como vitamina B₆). En las reacciones de transaminación que utilizan enzimas de transaminasas, el grupo amino del donador de amino se transfiere a la coenzima para producir un subproducto ceto, mientras que el piridoxal-5'-fosfato se convierte en fosfato de piridoxamina. El piridoxal-5'-fosfato se regenera mediante reacción con un compuesto ceto diferente (el aceptor de amino). La transferencia del grupo amino del fosfato de piridoxamina al aceptor de amino produce una amina quiral y regenera la coenzima. En algunas realizaciones, el piridoxal-5'-fosfato se puede reemplazar por otros miembros de la familia de la vitamina B₆, que incluye piridoxina (PN), piridoxal (PL), piridoxamina (PM) y sus homólogos fosforilados; fosfato de piridoxina (PNP) y fosfato de piridoxamina (PMP).

"Secuencia codificante" se refiere a esa porción de un ácido nucleico (por ejemplo, un gen) que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína.

"De origen natural" o "silvestre" se refiere a la forma que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos de origen natural o de tipo silvestre es una secuencia presente en un organismo que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente mediante manipulación humana.

"Recombinante" o "modificado" o "de origen no natural" cuando se utiliza con referencia a, por ejemplo, una célula, ácido nucleico o polipéptido, se refiere a un material, o un material que corresponde a la forma natural o nativa del material, que se ha modificado de una manera que de otro modo no existiría en la naturaleza, o es idéntico al mismo pero producido o derivados de materiales sintéticos y/o mediante manipulación utilizando técnicas recombinantes. Los ejemplos no limitantes incluyen, entre otros, células recombinantes que expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otro modo se expresan a un nivel diferente.

"Porcentaje de identidad de secuencia" y "porcentaje de homología" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a comparaciones entre polinucleótidos y polipéptidos, y se determinan al comparar dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia de polinucleótido o polipéptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, espacios) en comparación con la secuencia de referencia para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se puede calcular al determinar el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico o el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividir el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicar el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Alternativamente, el porcentaje se puede calcular al determinar el número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico o el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias o una base de ácido nucleico o residuo de aminoácido se alinea con un espacio para producir el número de posiciones coincidentes, dividir el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicar el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que existen muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software GCG Wisconsin), o

mediante inspección visual (véase en general, Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)). Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul et al., 1977, Nucleic Acids Res. 3389-3402, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de puntuación alta (HSP) al identificar palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul et al, supra). Estas coincidencias iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar PAS más largas que las contengan. Luego, las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización por residuos con emparejamiento erróneo; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada cae en una cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos con puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff and Henikoff, 1989, Proc Natl Acad Sci USA 89:10915).

La determinación de ejemplo de la alineación de secuencia y % de identidad de secuencia puede emplear los programas BESTFIT o GAP en el paquete de software GCG Wisconsin (Accelrys, Madison WI), utilizando los parámetros predeterminados proporcionados.

"Secuencia de referencia" se refiere a una secuencia definida utilizada como base para una comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, un segmento de un gen o secuencia de polipéptidos de longitud completa. Generalmente, una secuencia de referencia tiene al menos 20 residuos de nucleótidos o aminoácidos en longitud, al menos 25 residuos en longitud, al menos 50 residuos en longitud o la longitud completa del ácido nucleico o polipéptido. Dado que dos polinucleótidos o polipéptidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia completa) que es similar entre las dos secuencias, y (2) puede comprender además una secuencia que es divergente entre las dos secuencias, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos o polipéptidos normalmente se realizan al comparar secuencias de los dos polinucleótidos o polipéptidos a través de una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. En algunas realizaciones, una "secuencia de referencia" se puede basar en una secuencia de aminoácidos primaria, donde la secuencia de referencia es una secuencia que puede tener uno o más cambios en la secuencia primaria. Por ejemplo, una "secuencia de referencia basada en la SEQ ID NO: 4 que tiene en el residuo que corresponde a X14 una valina" o X14V se refiere a una secuencia de referencia en la que el residuo correspondiente a X14 en la SEQ ID NO: 4, que es una tirosina, se ha cambiado a valina.

"Ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos aproximadamente 20 posiciones de nucleótidos o residuos de aminoácidos contiguos en el que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia de al menos 20 nucleótidos o aminoácidos contiguos y en el que la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, espacios) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La ventana de comparación puede tener más de 20 residuos contiguos e incluye, opcionalmente, 30, 40, 50, 100 o ventanas más largas.

"Identidad sustancial" se refiere a una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos que tiene al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia, al menos un 85 por ciento de identidad y 89 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más usualmente al menos un 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de residuos, frecuentemente sobre una ventana de al menos 30-50 residuos, en la que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula al comparar la secuencia de referencia con una secuencia que incluye supresiones o adiciones que totalizan el 20 por ciento o menos de la referencia secuencia sobre la ventana de comparación. En realizaciones específicas aplicadas a polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias de polipéptidos, cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT que utilizan pesos de espacios predeterminados, comparten al menos el 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos el 89 por ciento de identidad de secuencia, al menos 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, 99 por ciento de identidad de secuencia). Preferiblemente, las posiciones de los residuos que no son idénticas se diferencian mediante sustituciones conservadoras de aminoácidos.

“Que corresponde a”, “referencia a” o “con respecto a” cuando se utiliza en el contexto de la numeración de una secuencia de aminoácidos o polinucleótidos determinada se refiere a la numeración de los residuos de una secuencia de referencia específica cuando la secuencia de aminoácidos o polinucleótidos determinada se compara con la secuencia de referencia. En otras palabras, el número de residuo o la posición del residuo de un polímero dado se designa con respecto a la secuencia de referencia en lugar de por la posición numérica real del residuo dentro de la secuencia de aminoácidos o polinucleótidos dada. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos determinada, tal como la de una transaminasa modificada por ingeniería, se puede alinear con una secuencia de referencia al introducir espacios para optimizar las coincidencias de residuos entre las dos secuencias. En estos casos, aunque los espacios estén presentes, la numeración del residuo en la secuencia de aminoácidos o polinucleótidos dada se realiza con respecto a la secuencia de referencia a la que se ha alineado.

“Diferencia de aminoácidos” o “diferencia de residuos” se refiere a un cambio en el residuo de aminoácido en una posición de una secuencia de polipéptidos con respecto al residuo de aminoácido en una posición correspondiente en una secuencia de referencia. Las posiciones de las diferencias de aminoácidos generalmente se denominan en el presente documento “Xn”, donde n se refiere a la posición correspondiente en la secuencia de referencia en la que se basa la diferencia de residuos. Por ejemplo, una “diferencia de residuo en la posición X14 en comparación con la SEQ ID NO: 4” se refiere a un cambio del residuo de aminoácido en la posición del polipéptido que corresponde a la posición 14 de la SEQ ID NO: 4. Por lo tanto, si el polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 4 tiene una tirosina en la posición 14, entonces una “diferencia de residuo en la posición X14 en comparación con la SEQ ID NO: 4” una sustitución de aminoácido de cualquier residuo distinto de tirosina en la posición del polipéptido que corresponde a la posición 14 de la SEQ ID NO: 4. En la mayoría de los casos en el presente documento, la diferencia de residuos de aminoácidos específicos en una posición se indica como “XnY”, donde “Xn” especifica la posición correspondiente como se describió anteriormente, y “Y” es el identificador de una sola letra del aminoácido encontrado en el polipéptido modificado (es decir, el residuo diferente al del polipéptido de referencia). En algunas realizaciones, puede aparecer más de un aminoácido en una posición de residuo específica, los aminoácidos alternativos se pueden enumerar en la forma XnY/Z, donde Y y Z representan residuos de aminoácidos alternativos. En ciertas ocasiones (por ejemplo, en la Tabla 2A y 2B), la presente divulgación también proporciona diferencias de aminoácidos específicas indicadas por la notación convencional “AnB”, donde A es el identificador de una sola letra del residuo en la secuencia de referencia, “n” es el número de la posición del residuo en la secuencia de referencia, y B es el identificador de una sola letra de la sustitución del residuo en la secuencia del polipéptido modificado. Además, en algunos casos, un polipéptido de la presente divulgación puede incluir una o más diferencias de residuos de aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia, que se indica mediante una lista de las posiciones especificadas donde se realizan cambios con respecto a la secuencia de referencia. La presente divulgación incluye secuencias de polipéptidos modificadas que comprenden una o más diferencias de aminoácidos que incluyen una o ambas sustituciones de aminoácidos conservadoras y no conservadoras.

“Sustitución conservadora de aminoácidos” se refiere a una sustitución de un residuo por un residuo diferente que tiene una cadena lateral similar y, por lo tanto, normalmente implica la sustitución del aminoácido en el polipéptido con aminoácidos dentro de la misma o similar clase definida de aminoácidos. A modo de ejemplo y sin limitación, un aminoácido con una cadena lateral alifática puede sustituirse por otro aminoácido alifático, por ejemplo, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un aminoácido con una cadena lateral de hidroxilo se sustituye con otro aminoácido con una cadena lateral de hidroxilo, por ejemplo, serina y treonina; un aminoácido que tiene cadenas laterales aromáticas se sustituye por otro aminoácido que tiene una cadena lateral aromática, por ejemplo, fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina; un aminoácido con una cadena lateral básica se sustituye por otro aminoácido con una cadena lateral básica, por ejemplo, lisina y arginina; un aminoácido con una cadena lateral ácida se sustituye por otro aminoácido con una cadena lateral ácida, por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico; y un aminoácido hidrófobo o hidrófilo se reemplaza por otro aminoácido hidrófobo o hidrófilo, respectivamente. Se proporcionan sustituciones conservadoras de ejemplo en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Residuo	Posibles sustituciones conservadoras
A, L, V, I	Otras alifáticas (A, L, V, I) Otras no polares (A, L, V, I, G, M)
G, M	Otras no polares (A, L, V, I, G, M)
D, E	Otras ácidas (D, E)
K, R	Otras básicas (K, R)
N, Q, S, T	Otras polares
H, Y, W, F	Otras aromáticas (H, Y, W, F)
C, P	Ninguna

“Sustitución no conservadora” se refiere a la sustitución de un aminoácido en el polipéptido con un aminoácido con propiedades de cadena lateral significativamente diferentes. Las sustituciones no conservadoras pueden utilizar aminoácidos entre los grupos definidos, en lugar de dentro de ellos, y afectan (a) la estructura de la estructura principal de péptido en el área de la sustitución (por ejemplo, prolina para glicina), (b) la carga o hidrofobicidad, o (c) la mayor

parte de la cadena lateral. A modo de ejemplo y sin limitación, una sustitución no conservadora de ejemplo puede ser un aminoácido ácido sustituido con un aminoácido básico o alifático; un aminoácido aromático sustituido con un aminoácido pequeño; y un aminoácido hidrófilo sustituido con un aminoácido hidrófobo.

“Supresión” se refiere a la modificación del polipéptido mediante la eliminación de uno o más aminoácidos del polipéptido de referencia. Las supresiones pueden comprender la eliminación de 1 o más aminoácidos, 2 o más aminoácidos, 5 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos, o 20 o más aminoácidos, hasta el 10 % del número total de aminoácidos, o hasta el 20 % del número total de aminoácidos que componen la enzima de referencia, reteniendo al mismo tiempo la actividad enzimática y/o reteniendo las propiedades mejoradas de una enzima de transaminasa modificada. Las supresiones se pueden dirigir a las porciones internas y/o porciones terminales del polipéptido. En diversas realizaciones, la supresión puede comprender un segmento continuo o puede ser discontinua.

“Inserción” se refiere a modificación del polipéptido mediante la adición de uno o más aminoácidos del polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, las enzimas de transaminasas modificadas mejoradas comprenden inserciones de uno o más aminoácidos en el polipéptido de transaminasas de origen natural, así como inserciones de uno o más aminoácidos en otros polipéptidos de transaminasas mejorados. Las inserciones pueden estar en las porciones internas del polipéptido, o en el terminal carboxi o amino. Las inserciones como se utilizan en el presente documento incluyen proteínas de fusión como se conoce en la técnica. La inserción puede ser un segmento contiguo de aminoácidos o estar separada por uno o más de los aminoácidos en el polipéptido de origen natural.

“Fragmento”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una supresión de terminal amino y/o de terminal carboxi, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia. Los fragmentos pueden tener al menos 14 aminoácidos de largo, al menos 20 aminoácidos de largo, al menos 50 aminoácidos de largo o más, y hasta el 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % y 99 % del polipéptido de transaminasa de longitud completa, por ejemplo el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o de la transaminasa modificada de la SEQ ID NO: 34.

“Polipéptido aislado” se refiere a un polipéptido que está sustancialmente separado de otros contaminantes que lo acompañan naturalmente, por ejemplo, proteínas, lípidos y polinucleótidos. El término abarca polipéptidos que se han eliminado o purificado de su entorno de origen natural o sistema de expresión (por ejemplo, célula huésped o síntesis in vitro). Las enzimas de transaminasas mejoradas pueden estar presentes dentro de una célula, presentes en el medio celular o preparadas en diversas formas, tales como lisados o preparaciones aisladas. Como tal, en algunas realizaciones, la enzima de transaminasa mejorada puede ser un polipéptido aislado.

“Polipéptido sustancialmente puro” se refiere a una composición en la que la especie de polipéptidos es la especie predominante presente (es decir, en términos molares o en peso es más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual en la composición), y generalmente es una composición sustancialmente purificada cuando la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento de las especies macromoleculares presentes en moles o % en peso. Generalmente, una composición de transaminasas sustancialmente pura comprenderá aproximadamente el 60 % o más, aproximadamente el 70 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, aproximadamente el 95 % o más y aproximadamente el 98 % o más de todas las especies macromoleculares por mol o % en peso presente en la composición. En algunas realizaciones, la especie objeto se purifica hasta una homogeneidad esencial (es decir, las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición mediante métodos de detección convencionales) en la que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular. Las especies de solventes, las moléculas pequeñas (< 500 Dalton) y las especies de iones elementales no se consideran especies macromoleculares. En algunas realizaciones, el polipéptido de transaminasas mejorado aislado es una composición de polipéptido sustancialmente pura.

“Estereoselectividad” se refiere a la formación preferencial en una reacción química o enzimática de un estereoisómero sobre otro. La estereoselectividad puede ser parcial, cuando se favorece la formación de un estereoisómero sobre el otro, o puede ser completa, cuando sólo se forma un estereoisómero. Cuando los estereoisómeros son enantiómeros, la estereoselectividad se denomina enantioselectividad, la fracción (normalmente informada como porcentaje) de un enantiómero en la suma de ambos. De manera alternativa, se informa comúnmente en la técnica (normalmente como un porcentaje) como el exceso enantiomérico (e.e.) calculado a partir del mismo de acuerdo con la fórmula $[\text{enantiómero mayor} - \text{enantiómero menor}] / [\text{enantiómero mayor} + \text{enantiómero menor}]$. Cuando los estereoisómeros son diastereoisómeros, la estereoselectividad se denomina como diastereoselectividad, la fracción (normalmente informada como porcentaje) de un diastereoisómero en una mezcla de dos diastereoisómeros, comúnmente informada alternativamente como exceso diastereomérico (d.e.). El exceso enantiomérico y el exceso diastereomérico son tipos de exceso estereomérico.

“Altamente estereoselectivo” se refiere a una reacción química o enzimática que es capaz de convertir un sustrato, por ejemplo, el Compuesto (IA), en su correspondiente producto de amina quiral, por ejemplo, el Compuesto (IIA), con al menos aproximadamente un 85 % de exceso estereomérico.

“Propiedad de enzima mejorada” se refiere a un polipéptido de transaminasa que exhibe una mejora en cualquier propiedad enzimática en comparación con una transaminasa de referencia. Para los polipéptidos de transaminasas modificados descritos en el presente documento, la comparación generalmente se hace con la enzima de transaminasa de tipo silvestre, aunque en algunas realizaciones, la transaminasa de referencia puede ser otra transaminasa modificada mejorada. Las propiedades enzimáticas cuya mejora es deseable incluyen, pero no se limitan a, actividad enzimática (que se puede expresar en términos de porcentaje de conversión del sustrato), termostabilidad, estabilidad del solvente, perfil de actividad de pH, requisitos de cofactor, refractariedad a inhibidores (por ejemplo, inhibición de sustrato o producto), estereoespecificidad y estereoselectividad (que incluye la enantioselectividad).

“Actividad enzimática aumentada” se refiere a una propiedad mejorada de los polipéptidos de transaminasas modificados, que se puede representar por un aumento en la actividad específica. (por ejemplo, producto producido/tiempo/peso de proteína) o un aumento en el porcentaje de conversión del sustrato al producto (por ejemplo, porcentaje de conversión de la cantidad inicial de sustrato a producto en un período de tiempo específico utilizando una cantidad específica de transaminasa) en comparación con la enzima de transaminasa de referencia. En los Ejemplos se proporcionan métodos de ejemplo para determinar la actividad enzimática. Cualquier propiedad que se relaciona con la actividad enzimática se puede ver afectada, que incluye las propiedades enzimáticas clásicas de K_m , $V_{m\max}$ o k_{cat} , cuyos cambios pueden conducir a un aumento de la actividad enzimática. Las mejoras en la actividad enzimática pueden ser desde aproximadamente 1.2 veces la actividad enzimática de la enzima de transaminasa de tipo silvestre correspondiente, hasta 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces o más actividad enzimática que la transaminasa de origen natural u otra transaminasa modificada a partir de la cual se derivaron los polipéptidos de transaminasa. La actividad de transaminasa se puede medir mediante cualquiera de los ensayos estándar, tales como al monitorizar los cambios en las propiedades espectrofotométricas de reactivos o productos. En algunas realizaciones, la cantidad de productos producidos se puede medir mediante separación por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) combinada con absorbancia UV o detección fluorescente después de la derivatización, tal como con o-ftaldialdehído (OPA). Las comparaciones de actividades enzimáticas se realizan utilizando una preparación definida de enzima, un ensayo definido bajo una condición establecida y uno o más sustratos definidos, como se describe con más detalle en el presente documento. Generalmente, cuando se comparan los lisados, se determinan los números de células y la cantidad de proteína ensayada, así como el uso de sistemas de expresión idénticos y células huésped idénticas para minimizar las variaciones en la cantidad de enzima producida por las células huésped y presente en los lisados.

“Conversión” se refiere a la conversión enzimática del(los) sustrato(s) en el(los) producto(s) correspondiente(s). “Porcentaje de conversión” se refiere al porcentaje del sustrato que se convierte en el producto dentro de un período de tiempo bajo condiciones específicas. Por lo tanto, la “actividad enzimática” o “actividad” de un polipéptido de transaminasa se puede expresar como “porcentaje de conversión” del sustrato al producto.

“Termoestable” se refiere a un polipéptido de transaminasa que mantiene una actividad similar (más del 60 % al 80 %, por ejemplo) después de la exposición a temperaturas elevadas (por ejemplo, 40-80 °C) durante un período de tiempo (por ejemplo, 0.5-24 horas) en comparación con la enzima de tipo silvestre.

“Estable al solvente” se refiere a un polipéptido de transaminasa que mantiene una actividad similar (más de por ejemplo, 60 % a 80 %) después de la exposición a concentraciones variables (por ejemplo, 5-99 %) de solvente (etanol, alcohol isopropílico, dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, acetona, tolueno, acetato de butilo, éter de metil tert-butilo, etc.) durante un período de tiempo (por ejemplo, 0.5-24 horas) en comparación con la enzima de tipo silvestre.

“Termoestable y estable en solventes” se refiere a un polipéptido de transaminasa que es tanto termoestable como estable en solventes.

“Hibridación estricta” se utiliza en el presente documento para referirse a condiciones bajo las cuales los híbridos de ácidos nucleicos son estables. Como saben los expertos en la técnica, la estabilidad de los híbridos se refleja en la temperatura de fusión (T_m) de los híbridos. En general, la estabilidad de un híbrido es función de la fuerza iónica, la temperatura, el contenido de G/C y la presencia de agentes caotrópicos. Los valores de T_m para polinucleótidos se pueden calcular utilizando métodos conocidos para predecir temperaturas de fusión (véase, por ejemplo, Baldino et al., *Methods Enzymology* 168:761-777; Bolton et al., 1962, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:1390; Bresslauer et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8893-8897; Freier et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9373-9377; Kierzek et al., *Biochemistry* 25:7840-7846; Rychlik et al., 1990, *Nucleic Acids Res* 18:6409-6412 (erratum, 1991, *Nucleic Acids Res* 19:698); Sambrook et al., supra; Suggs et al., 1981, *In Developmental Biology Using Purified Genes* (Brown et al., eds.), pp. 683-693, Academic Press; y Wetmur, 1991, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26:227-259). En algunas realizaciones, el polinucleótido codifica el polipéptido divulgado en el presente documento y se hibrida bajo condiciones definidas, tales como condiciones moderadamente estrictas o muy estrictas, con el complemento de una secuencia que codifica una enzima de transaminasa modificada de la presente divulgación.

La “rigurosidad de la hibridación” se refiere a condiciones de hibridación, tales como condiciones de lavado, en la hibridación de ácidos nucleicos. Generalmente, las reacciones de hibridación se realizan en condiciones de menor

rigurosidad, seguidas de lavados de rigor variable pero mayor. El término "hibridación moderadamente rigurosa" se refiere a condiciones que permiten que el ADN diana se una a un ácido nucleico complementario que tiene aproximadamente un 60 % de identidad, preferiblemente aproximadamente un 75 % de identidad, aproximadamente un 85 % de identidad con el ADN diana, con más de aproximadamente un 90 % de identidad con el polinucleótido diana. Condiciones moderadamente rigurosas de ejemplo son condiciones equivalentes a la hibridación en formamida al 50 %, solución de Denhart 5 X, SSPE 5 X, SDS al 0.2 % a 42 °C, seguido de lavado en SSPE al 0.2 X, SDS al 0.2 % a 42 °C. "Hibridación de alta rigurosidad" se refiere generalmente a condiciones que están a aproximadamente 10 °C o menos de la temperatura de fusión térmica T_m como se determina bajo las condiciones de solución para una secuencia de polinucleótidos definida. En algunas realizaciones, una condición de alta rigurosidad se refiere a condiciones que permiten la hibridación de solo aquellas secuencias de ácidos nucleicos que forman híbridos estables en NaCl 0.018 M a 65 °C (es decir, si un híbrido no es estable en NaCl 0.018 M a 65 °C, no será estable bajo condiciones de alta rigurosidad, como se contempla en el presente documento). Se pueden proporcionar condiciones de alta rigurosidad, por ejemplo, mediante hibridación en condiciones equivalentes a formamida al 50 %, solución de Denhart 5 X, SSPE 5 X, SDS al 0.2 % a 42 °C, seguido de lavado en SSPE al 0.1 X y SDS al 0.1 % a 65 °C. Otra condición de alta rigurosidad es la hibridación en condiciones equivalentes a la hibridación en SSC 5 X que contiene SDS al 0.1 % (p:v) a 65 °C y el lavado en SSC 0.1 X que contiene SDS al 0.1 % a 65 °C. Otras condiciones de hibridación de alta rigurosidad, así como condiciones moderadamente rigurosas, se describen en las referencias citadas anteriormente.

Polinucleótido "heterólogo" se refiere a cualquier polinucleótido que se introduce en una célula huésped mediante técnicas de laboratorio, e incluye polinucleótidos que se eliminan de una célula huésped, se someten a manipulación de laboratorio y luego se reintroducen en una célula huésped.

"Codón optimizado" se refiere a cambios en los codones del polinucleótido que codifica una proteína a aquellos utilizados preferiblemente en un organismo particular de tal manera que la proteína codificada se exprese eficientemente en el organismo de interés. Aunque el código genético es degenerado en el sentido de que la mayoría de los aminoácidos están representados por varios codones, llamados codones "parecidos" o "sinónimos", es bien sabido que el uso de codones por organismos particulares no es aleatorio y está sesgado hacia tripletes de codones particulares. Este sesgo en el uso de codones puede ser mayor en referencia a un gen determinado, genes de función común u origen ancestral, proteínas altamente expresadas versus proteínas con un número de copias bajo y las regiones codificantes de proteínas agregadas del genoma de un organismo. En algunas realizaciones, los polinucleótidos que codifican las enzimas de transaminasas se pueden optimizar con codones para una producción óptima a partir del organismo huésped seleccionado para la expresión.

"Codones de sesgo de alto uso de codones preferidos, óptimos" se refiere indistintamente a codones que se utilizan con mayor frecuencia en las regiones codificantes de proteínas que otros codones que codifican el mismo aminoácido. Los codones preferidos se pueden determinar en relación con el uso de codones en un solo gen, un conjunto de genes de función u origen común, genes altamente expresados, la frecuencia de codones en las regiones codificantes de proteínas agregadas de todo el organismo, la frecuencia de codones en las regiones codificantes de proteína agregada de organismos relacionados, o combinaciones de las mismas. Los codones cuya frecuencia aumenta con el nivel de expresión génica normalmente son codones óptimos para la expresión. Se conoce una variedad de métodos para determinar la frecuencia de codones (por ejemplo, uso de codones, uso relativo de codones sinónimos) y la preferencia de codones en organismos específicos, que incluyen el análisis multivariado, por ejemplo, utilizando análisis de agrupaciones o análisis de correspondencia, y el número efectivo de codones utilizados. en un gen (véase CodonPreference, Genetics Computer Group Wisconsin Package; CodonW, John Peden, University of Nottingham; McInerney, J. O, 1998, *Bioinformatics* 14:372-73; Stenico et al., 1994, *Nucleic Acids Res.* 22:2437-46; Wright, F., 1990, *Gene* 87:23-29). Se presentan tablas de uso de codones disponibles para una lista cada vez mayor de organismos (véase, por ejemplo, Wada et al., 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118; Nakamura et al., 2000, *Nucl. Acids Res.* 28:292; Duret, et al., supra; Henaut y Danchin, "Escherichia coli and Salmonella," 1996, Neidhardt, et al. Eds., ASM Press, Washington D.C., p. 2047-2066. La fuente de datos para obtener el uso de codones puede depender de cualquier secuencia de nucleótidos disponible capaz de codificar una proteína. Estos conjuntos de datos incluyen secuencias de ácidos nucleicos que realmente se sabe que codifican proteínas expresadas (por ejemplo, secuencias codificantes de proteínas completas-CDS), etiquetas de secuencias expresadas (ESTS) o regiones codificantes predichas de secuencias genómicas (véase, por ejemplo, Mount, D., *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*, Chapter 8, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; Uberbacher, E. C., 1996, *Methods Enzymol.* 266:259-281; Tiwari et al., 1997, *Comput. Appl. Biosci.* 13:263-270).

"Secuencia de control" se define en el presente documento para incluir todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido y/o polipéptido de la presente divulgación. Cada secuencia de control puede ser nativa o extraña a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. Dichas secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptidos señal y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control se pueden proporcionar con ligadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligación de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido.

"Ligado operativamente" se define en el presente documento como una configuración en la que una secuencia de control está colocada apropiadamente (es decir, en una relación funcional) en una posición en relación con un polinucleótido de interés de tal manera que la secuencia de control dirige o regula la expresión del polinucleótido y/o polipéptido de interés.

"Secuencia promotora" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido de interés, tal como una secuencia codificante. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcional, que median en la expresión de un polinucleótido de interés. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección, que incluye promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares, ya sean homólogos o heterólogos de la célula huésped.

"Condiciones de reacción adecuadas" se refieren a aquellas condiciones en la solución de reacción biocatalítica (por ejemplo, rangos de carga de enzima, carga de sustrato, carga de cofactor, temperatura, pH, tampones, cosolventes, etc.) bajo los cuales un polipéptido de transaminasa de la presente divulgación es capaz de convertir un compuesto de sustrato en un compuesto de producto (por ejemplo, conversión del Compuesto (IA) al Compuesto (IIA)). En la presente divulgación se proporcionan "condiciones de reacción adecuadas" de ejemplo y se ilustran mediante los Ejemplos.

"Carga", tal como en "carga de compuesto" o "carga de enzima" o "carga de cofactor" se refiere a la concentración o cantidad de un componente en una mezcla de reacción al inicio de la reacción.

"Sustrato" en el contexto de un proceso mediado por biocatalizador se refiere al compuesto o molécula sobre el que actúa el biocatalizador. Por ejemplo, un sustrato de ejemplo para el biocatalizador de transaminasas en el proceso divulgado en el presente documento es el compuesto (IA).

"Producto" en el contexto de un proceso mediado por biocatalizador se refiere al compuesto o molécula que resulta de la acción del biocatalizador. Por ejemplo, un producto de ejemplo para el biocatalizador de transaminasas en el proceso divulgado en el presente documento es el compuesto (IIA).

La presente divulgación proporciona métodos (que no se reivindican, pero los compuestos de la invención pueden encontrar uso) para utilizar polipéptidos que tienen actividad de transaminasa para la síntesis de (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina en exceso enantiomérico de (R)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina. Cuando la descripción se refiere a polipéptidos, se debe entender que también describe los polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

Las aminotransferasas, también conocidas como transaminasas, catalizan la transferencia de un grupo amino desde una amina primaria de un sustrato donador de amino al grupo carbonilo (por ejemplo, un grupo ceto o aldehído) de una molécula aceptora de amino. Se han identificado aminotransferasas en varios organismos, tales como *Alcaligenes denitrificans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*, *Brucella melitensis*, *Burkholderia malle*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chromobacterium violaceum*, *Oceanicola granulosus* HTCC2516, *Oceanobacter* sp. RED65, *Oceanospirillum* sp. MED92, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium* sp. (cepa NGR234), *Vibrio fluvialis*, *Bacillus thuringiensis*, y *Klebsiella pneumoniae* (Shin et al., 2001, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:1782-1788).

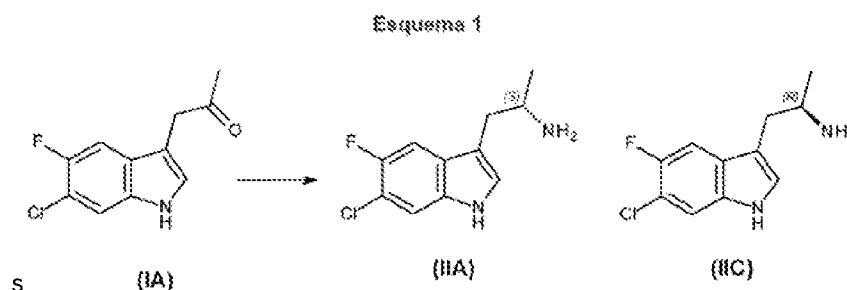
Las transaminasas son útiles para la resolución quiral de aminas racémicas al explotar la capacidad de las transaminasas para llevar a cabo la reacción de manera estereoespecífica, es decir, conversión preferencial de un enantiómero a la cetona correspondiente, dando como resultado una mezcla enriquecida en el otro enantiómero (véase, por ejemplo, Koselewski et al., 2009, *Org. Lett.* 11(21):4810-2). La estereoselectividad de las transaminasas en la conversión de una cetona en la amina correspondiente también hace que estas enzimas sean útiles en la síntesis asimétrica de aminas ópticamente puras a partir de los correspondientes compuestos ceto (véase, por ejemplo, Höhne et al., "Biocatalytic Routes to Optically Active Amines," *Chem. Cat. Chem.* 1(1):42 - 51; Zua and Hua, 2009, *Biotechnol. J.* 4(10):1420-31).

La ω -transaminasa de *Vibrio fluvialis* (ω -vT) muestra una alta enantioselectividad para el enantiómero (S) de aminas quirales y tiene una especificidad de sustrato distintiva para las aminas aromáticas quirales (Shin and Kim, 2001, *J. Org. Chem.* 67:2848-2853). La alta enantioselectividad de 0 ω -vT se ha aplicado a la resolución quiral de aminas (H. Yun, B.-K. Cho, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 87, 772-778; J.-S. Shin, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* 1997, 55, 348-358; M. Hühne, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* 2008, 350,802-807). La enzima también se ha utilizado en la síntesis asimétrica de aminas ópticamente puras utilizando un sustrato de cetona proquiral. Sin embargo, la limitación en la síntesis asimétrica es el equilibrio desfavorable de la reacción inversa (Shin and Kim, 1999, *Biotechnol. Bioeng.* 65, 206-211), inhibición de la enzima 0 ω -vT por el producto amina (Shin et al., 2001, *Biotechnol. Bioeng.* 73:179-187; Yun y Kim, 2008, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(11):3030-3033); baja actividad sobre aceptores de amino que tienen cadenas laterales voluminosas, tales como grupos aromáticos Shin and Kim, 2002, *J. Org. Chem.* 67:2848-2853); y baja estabilidad enzimática (Yun and Kim, supra).

Las transaminasas modificadas derivadas de la transaminasa de *Vibrio fluvialis* que tienen una mayor resistencia a las cetonas alifáticas se describen en Yun et al., 2005, Appl Environ Microbiol., 71(8):4220-4224) mientras ω -vT con especificidad ampliada del sustrato donador de aminoácidos se describen en Cho et al., 2008, Biotechnol Bioeng. 99(2):275-84. Las Publicaciones de patentes WO2010081053 y US20100209981 describen ω -vT modificados que tienen mayor estabilidad a la temperatura y/o solvente orgánico y actividad enzimática hacia moléculasceptoras de amino estructuralmente diferentes.

La presente divulgación se refiere a métodos (que no se reivindican, pero los compuestos de la invención pueden encontrar uso) para utilizar polipéptidos de transaminasas modificados derivados de *V. fluvialis* que median eficientemente la conversión de 1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-ona, para producir el compuesto (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina en exceso enantiomérico. Significativamente, la divulgación identifica posiciones de residuos de aminoácidos y mutaciones correspondientes en el polipéptido de transaminasa que aumentan la actividad enzimática, enantioselectividad, estabilidad y refractariedad a la inhibición del producto en la conversión de 1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-ona, para producir el compuesto (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, los compuestos reivindicados se pueden utilizar en métodos de uso de polipéptidos que son capaces de convertir el compuesto de sustrato convertidor (IA), 1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-ona, para producir el compuesto (IIA), (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina,



en presencia de un donador de amino, donde (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina se produce en exceso enantiomérico del compuesto (CII), (R)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina.

Los polipéptidos utilizados en los métodos pueden ser transaminasas de origen no natural modificadas para mejorar sus propiedades en comparación con el polipéptido de *V. fluvialis* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2, u otro polipéptido modificado, por ejemplo SEQ ID NO: 4. Estos polipéptidos de transaminasas modificados se adaptaron para una conversión eficiente de 1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-ona a (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina tienen una o más diferencias de residuos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o un polipéptido de transaminasa modificado de referencia, tal como el polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 4. Las diferencias de residuos están asociadas con mejoras en las propiedades enzimáticas, que incluyen la actividad enzimática, estabilidad de la enzima y resistencia a la inhibición por la amina del producto.

Los polipéptidos de transaminasas modificados utilizados en la presente divulgación pueden mostrar una mayor actividad en la conversión del sustrato 1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-ona al producto (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina en exceso enantiomérico en un tiempo definido con la misma cantidad de enzima en comparación con el tipo silvestre o una enzima modificada de referencia. En algunas realizaciones, el polipéptido de transaminasa modificado tiene al menos aproximadamente 1.2 veces, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces o 50 veces o más la actividad en comparación con el polipéptido representado por la SEQ ID NO: 4 bajo condiciones de reacción adecuadas.

Los polipéptidos de transaminasas modificados utilizados en la presente divulgación pueden tener una mayor estabilidad a la temperatura y/o a los solventes utilizados en la reacción de conversión en comparación con el tipo silvestre o una enzima modificada de referencia. El polipéptido de transaminasa modificado puede tener al menos 1.2 veces, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o más la estabilidad en comparación con el polipéptido de la SEQ ID NO: 4 bajo condiciones de reacción adecuadas.

Los polipéptidos de transaminasas modificados utilizados en la presente divulgación pueden tener una mayor refractariedad o resistencia a la amina del producto (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina en comparación con el tipo silvestre o una enzima modificada de referencia. El polipéptido de transaminasa modificado puede tener al menos 1.2 veces, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o más resistencia a la inhibición por 1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina, en particular (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina, en comparación con el polipéptido representado por la SEQ ID NO: 4 bajo condiciones de reacción adecuadas, como se describe con más detalle a continuación.

Los polipéptidos de transaminasas modificados utilizados en la presente divulgación son capaces de convertir el sustrato 1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-ona al producto (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina en exceso enantiomérico superior al 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99.5 o mayor para (R)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2- bajo condiciones de reacción adecuadas.

Los polipéptidos de transaminasas modificados utilizados en la presente divulgación son capaces de convertir el compuesto (IA) al compuesto (IIA) con mayor tolerancia a la presencia de sustrato con respecto al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 4 bajo condiciones de reacción adecuadas. Por lo tanto, los polipéptidos de transaminasas modificados son capaces de convertir el compuesto de sustrato (IIA) al compuesto de producto (IA) en presencia de una concentración de carga de sustrato de al menos aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 5 g/l, aproximadamente 10 g/l, aproximadamente 20 g/l, aproximadamente 30 g/l, aproximadamente 40 g/l, aproximadamente 50 g/l, aproximadamente 70 g/l, aproximadamente 100 g/l, aproximadamente 125 g/l, aproximadamente 150 g/l, aproximadamente 175 g/l o aproximadamente 200 g/l o más con un porcentaje de conversión de al menos aproximadamente al menos aproximadamente 50 %, 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 %, en un tiempo de reacción de aproximadamente 72 h o menos, aproximadamente 48 h o menos, aproximadamente 36 h o menos, o aproximadamente 24 h o menos, bajo condiciones de reacción adecuadas.

Las condiciones de reacción adecuadas bajo las cuales las propiedades mejoradas descritas anteriormente de los polipéptidos modificados llevan a cabo la conversión se pueden determinar con respecto a concentraciones o cantidades de polipéptido, sustrato, cofactor, tampón, cosolvente, pH y/o condiciones que incluyen temperatura. y tiempo de reacción, como se describe a continuación y en los Ejemplos.

Los polipéptidos modificados a modo de ejemplo utilizados en la presente divulgación se han asociado con sus propiedades mejoradas para la conversión del compuesto (IA) al compuesto (IIA) y que incluyen una o más diferencias de residuos en comparación con la SEQ ID NO: 2 en las siguientes posiciones de residuos: X9; X14; X18; X21; X26; X31; X33; X41; X45; X47; X57; X70; X86; X88; X107; X113; X132; X133; X146; X147; X148; X153; X163; X168; X173; X177; X203; X211; X233T; X235; X244; X250; X284; X294; X314; X315; X318; X323; X324; X324; X346; X383; X391; X395; X398; X400; X417; X419; X420; X423; X424; X427; X448; y X451. Las diferencias de aminoácidos específicas en cada una de estas posiciones que se asocian con las propiedades mejoradas de los polipéptidos de ejemplo de la Tabla 2A y 2B incluyen: X9T; X14V; X18A; X21H; X26R; X31M; X31S; X33T; X41L; X45H; X47N; X57F; X57Y; X70A; X86D; X86Y; X88A; X88L; X107P; X113L; X113V; X132F; X133R; X146L; X147K; X148Q; X148R; X153S; X163F; X163I; X163L; X163R; X163V; X168K; X168S; X173A; X177L; X203S; X211K; X233T; X235P; X244T; X250A; X284A; X294V; X314N; X315G; X318D; X323T; X324G; X324H; X346L; X383V; X391A; X395P; X398L; X398V; X398W; X400G; X417M; X419S; X420N; X423I; X424V; X424A; X427Y; X448E; y X451D.

Las diferencias de residuos en comparación con la transaminasa modificada representada por la SEQ ID NO: 4 incluyen aquellas en las posiciones de residuos: X14; X26; X31; X33; X41; X47; X57; X70; X86; X88; X107; X113; X132; X148; X163; X168; X173; X203; X250; X284; X314; X315; X324; X346; X395; X398; X400; X417; X419; X420; X423; X424; X448; y X451. Las diferencias de aminoácidos específicas en estas posiciones incluyen: X14V; X26R; X31S; X33T; X41L; X47N; X57F; X57Y; X70A; X86D; X88A; X88L; X107P; X113L; X113V; X132F; X148Q; X148R; X163I; X163L; X163R; X163V; X168K; X168S; X173A; X203S; X250A; X284A; X314N; X315G; X324H; X346L; X395P; X398L; X398V; X398W; X400G; X417M; X419S; X420N; X423I; X424V; X448E; y X451D. Aunque también se producen diferencias de residuos en comparación con la SEQ ID NO: 4 en las posiciones de residuos X153 y X383, estas diferencias representan reversiones al residuo de aminoácido presente en la secuencia tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2, lo que indica que las interconversiones entre los aminoácidos S y V en la posición del residuo X153 y entre los aminoácidos A y V en la posición del residuo X383 no tienen efectos perjudiciales significativos sobre las propiedades de la enzima modificada.

La información de estructura y función de polipéptidos de transaminasas de ejemplo de origen no natural (o modificados) utilizados en el método de la presente divulgación se muestran a continuación en la Tabla 2A y 2B. Los identificadores de secuencia impares (es decir, SEQ ID NO) se refieren a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos proporcionada por las SEQ ID NO pares, y las secuencias se proporcionan en el archivo electrónico de listado de secuencias que acompaña a esta divulgación. Las diferencias de residuos de aminoácidos se basan en la comparación con la secuencia de referencia de la SEQ ID NO: 4, que es una transaminasa modificada derivada del polipéptido ω -vT tipo silvestre que tiene las siguientes diferencias de residuos de 24 aminoácidos A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163F; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y en relación con la SEQ ID NO: 2. La actividad de cada polipéptido modificado con respecto al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 4 se determinó como la conversión del sustrato cetona 1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-ona, para producir el compuesto de amina (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina durante un período de tiempo y temperatura establecidos en un ensayo de alto rendimiento (HTP), que se utilizó como cribado principal. Los valores del ensayo HTP en Tabla 2A se determinaron utilizando lisados celulares de E. coli. transparentes en formato de placa de pocillos de ~200 μ l de volumen por pocillo siguiendo las condiciones de reacción del ensayo como se indica en la tabla y los ejemplos. En algunos casos,

se utilizó un ensayo de polvo de matraz agitado (SFP) y/o polvo procesado posteriormente (DSP) como cribado secundario para evaluar las propiedades de las transaminasas modificadas, cuyos resultados se proporcionan en la Tabla 2B. Las formas SFP y DSP proporcionan una preparación en polvo más purificada de los polipéptidos modificados. Por ejemplo, la transaminasa modificada en las preparaciones de SFP es aproximadamente el 30 % de la proteína total, mientras que las preparaciones de DSP pueden contener transaminasas modificadas que son aproximadamente el 80 % de la proteína total.

Los niveles de actividad (es decir, “+” “++”, etc.) se definen de la siguiente manera: “+” indica una actividad 1.2 veces o mayor en comparación con la de la SEQ ID NO: 4 para polipéptido de transaminasa modificado SEQ ID NO: 6 a 14, y 1.2 o mayor actividad en comparación con la de la SEQ ID NO: 8 para polipéptido de transaminasa modificado SEQ ID NO: 16 a 154; y un “++” indica una actividad 5 veces o mayor en comparación con la de la SEQ ID NO: 4 para polipéptidos de transaminasas modificados de la SEQ ID NO: 6 a 14, y 5 veces o mayor actividad en comparación con la de la SEQ ID NO: 8 para polipéptidos de transaminasas modificados SEQ ID NO: 16 a 154. Los datos de estabilidad se obtienen al incluir las siguientes cantidades de producto (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina en el ensayo y comparar la actividad con la de una enzima de referencia bajo las mismas condiciones: 14 g/l para el análisis de los polipéptidos de transaminasas modificados de la SEQ ID NO. 6 a 14 y 16 g/l para el análisis de los polipéptidos de transaminasas modificados de la SEQ ID NO. 16 a 154. La evaluación de la estabilidad se realizó al comparar actividades a dos temperaturas diferentes, 55 °C y 50 °C.

Tabla 2A: Polipéptidos modificados y mejoras enzimáticas relativas utilizando preparaciones de HTP

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Actividad ^a ^b	Estabilidad ^b	Tolerancia del producto ^{e,c,d}
1/2	n/a		Nd	nd	nd
3/4	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163F; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;		“Control”	“Control”	“Control”
5/6	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	F163L;	+	+	+
7/8	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163I; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	F163I;	+	+	nd
9/10	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163R; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	F163R;	+	nd	nd
13/14	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163V; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	F163V;	+	nd	nd
15/16	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; R88L; Y113L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; R88L; Y113L; F163L;	+	+	++

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Actividad ^a _b	Estabilidad ^b	Tolerancia del producto ^{e,c,d}
17/18	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; W57F; F163L;	Nd	+	+
19/20	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; V33T; N45H; W57F; F86Y; R88L; Y113L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y; V448E;	Y14V; V33T; W57F; R88L; Y113L; F163L; V448E;	Nd	+	nd
21/22	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; R88A; Y113L; A133R; R146L; W147K; N148Q; V153S; K163L; V177L; R203S; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; R88A; Y113L; N148Q; L163L; R203S;	+	+	+
23/24	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; W57F; F86Y; R88L; Y113L; A133R; R146L; W147K; N148Q; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y; V448E;	W57F; R88L; Y113L; N148Q; L163L; V448E;	+	+	+
25/26	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; F163L;	Nd	nd	+
27/28	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; R88A; A133R; R146L; W147K; N148Q; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; R88A; N148Q; L163L;	+	+	+
29/30	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; R88L; Y113V; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; R88L; Y113V; F163L;	+	+	+
31/32	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; N45H; W57F; F86Y; Y113V; A133R; R146L; W147K; N148Q; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; W57F; Y113V; N148Q; F163L;	+	+	nd

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Actividad ^a _b	Estabilidad ^b	Tolerancia del producto ^{e,c,d}
33/34	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; N148Q; V153S; K163I; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; W57F; N148Q; L163I;	Nd	+	+
35/36	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; F163L;	Nd	+	+
37/38	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; W57F; F86Y; Y113L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; W57F; Y113L; F163L;	Nd	+	+
39/40	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163I; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; L163I;	Nd	+	+
41/42	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; W57F; F86Y; R88L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163I; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; W57F; R88L; L163I;	Nd	+	+
43/44	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; Y113V; A133R; R146L; W147K; V153S; K163I; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; Y113V; L163I;	Nd	+	nd
45/46	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; W57F; F86Y; R88L; Y113L; Un 133R; R146L; W147K; N148Q; V153S; K163I; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; W57F; R88L; Y113L; N148Q; L163I;	Nd	+	+
47/48	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; N45H; W57F; F86Y; R88L; A133R; R146L; W147K; N148Q; V153S; K163I; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; W57F; R88L; N148Q; L163I;	+	+	+

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Actividad ^a ^b	Estabilidad ^b	Tolerancia del producto ^{e,c,d}
49/50	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; W57F; F86Y; R88L; Y113V; A133R; R146L; W147K; N148R; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; W57F; R88L; Y113V; N148R; F163L;	Nd	+	nd
51/52	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; R88A; Y113V; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; R88A; Y113V; L163I;	+	+	+
53/54	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; D250A; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; F163L; D250A;	Nd	nd	+
55/56	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; R88L; Y113L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; R88L; Y113L; L163I;	+	+	+
57/58	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; N45H; W57F; F86Y; R88A; Y113L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; W57F; R88A; Y113L; F163L;	Nd	nd	+
59/60	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; W57F; F86Y; Y113L; A133R; R146L; W147K; N148R; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; W57F; Y113L; N148R; F163L;	Nd	+	+
61/62	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; N45H; W57F; F86Y; Y113L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; W57F; Y113L; L163I;	+	+	+
63/64	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; R88L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; L173A; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; S400G; L417M; C424V; F427Y;	D86Y; R88L; F163L; L173A; S400G; A424V;	+	+	nd

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Actividad ^a _b	Estabilidad ^b	Tolerancia del producto ^{e,c,d}
65/66	A9T; G18A; D21H; V31M; V33T; N45H; F86Y; R88L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163F; L173A; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324G; T391A; S400G; C424A; F427Y;	V33T; D86Y; R88L; L173A; V383A; S400G;	+	+	nd
67/68	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86D; A133R; R146L; W147K; V153S; K163F; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324H; A383V; T391A; S400G; C424A; F427Y;	Y86D; G324H; S400G;	+	+	nd
69/70	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86D; A133R; R146L; W147K; V153S; K163F; V168K; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324H; T391A; S400G; C424A; F427Y;	Y86D; V168K; G324H; V383A; S400G;	Nd	+	nd
71/72	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86D; A133R; R146L; W147K; V153S; K163F; L173A; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324H; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y86D; L173A; G324H;	Nd	+	nd
73/74	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86D; A133R; R146L; W147K; V153S; K163F; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; T391A; S400G; C424A; F427Y;	Y86D; V383A; S400G;	Nd	+	+
75/76	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86D; A133R; R146L; W147K; V153S; K163F; L173A; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; S400G; C424A; F427Y; V448E;	Y86D; L173A; S400G; V448E;	Nd	+	+
77/78	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86D; A133R; R146L; W147K; V153S; K163F; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324H; A383V; T391A; S400G; C424A; F427Y;	Y86D; G324H; S400G;	Nd	+	nd
79/80	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86D; A133R; R146L; W147K; V153S; K163F; L173A; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324H; A383V; T391A; S400G; C424A; F427Y;	Y86D; L173A; G324H; S400G;	Nd	+	nd

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Actividad ^a _b	Estabilidad ^b	Tolerancia del producto ^{e,c,d}
81/82	A9T; G18A; D21H; V31M; 141L; N45H; W57Y; D70A; F86Y; D107P; H132F; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; 1314N; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; S398V; C424A; F427Y; E451D;	I41L; W57Y; D70A; D107P; H132F; F163L; 1314N; S398V; E451D;	Nd	+	nd
83/84	A9T; G18A; D21H; V31M; 141L; N45H; R47N; W57Y; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; S398V; L423I; C424A; F427Y;	141L; R47N; W57Y; F163L; E315G; S398V; L423I;	Nd	+	nd
85/86	A9T; G18A; D21H; V31M; 141L; N45H; W57Y; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; S398V; C424A; F427Y;	I41L; W57Y; F163L; E315G; S398V;	+	+	nd
87/88	A9T; G18A; D21H; V31M; 141L; N45H; W57Y; F86Y; D107P; H132F; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; G395P; S398W; C424A; F427Y;	I41L; W57Y; D107P; H132F; F163L; E315G; G395P; S398W;	+	+	nd
89/90	A9T; G18A; D21H; V31M; 141L; N45H; F86Y; D107P; H132F; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; S398V; C424A; F427Y; E451D;	I41L; D107P; H132F; F163L; S398V; E451D;	+	+	nd
91/92	A9T; G18A; D21H; V31M; 141L; N45H; W57Y; F86Y; D107P; H132F; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; 1314N; E315G; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; S398V; L423I; C424A; F427Y; E451D;	I41L; W57Y; D107P; H132F; F163L; 1314N; E315G; S398V; L423I; E451D;	+	+	nd
93/94	A9T; G18A; D21H; V31M; 141L; N45H; W57Y; F86Y; D107P; H132F; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; S398V; L423I; C424A; F427Y;	I41L; W57Y; D107P; H132F; F163L; E315G; S398V; L423I;	Nd	+	nd

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Actividad ^a _b	Estabilidad ^b	Tolerancia del producto ^{e,c,d}
95/96	A9T; G18A; D21H; V31M; 141L; N45H; W57Y; D70A; F86Y; D107P; H132F; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; 1314N; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; S398W; Q419S; C424A; F427Y;	I41L; W57Y; D70A; D107P; H132F; F163L; 1314N; S398W; Q419S;	Nd	+	nd
97/98	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K1631; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; 1314N; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; G395P; S398W; C424A; F427Y; E451D;	M31S; W57F; L163I; 1314N; A346L; G395P; S398W; E451D;	+	+	+
99/100	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K1631; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398L; Q419S; C424A; F427Y;	M31S; W57F; L163I; E315G; A346L; S398L; Q419S;	+	+	nd
101/102	A9T; G18A; D21H; V31S; 141L; N45H; W57F; F86Y; R88A; A133R; R146L; W147K; V153S; K1631; V168S; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398V; C424A; F427Y; E451D;	M31S; 141L; W57F; R88A; L163I; V168S; A346L; S398V; E451D;	Nd	+	nd
103/104	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V168S; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398V; Q419S; C424A; F427Y;	M31S; W57F; F163L; V168S; E315G; A346L; S398V; Q419S;	+	+	nd
105/106	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; 1314N; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; S398W; C424A; F427Y;	M31S; W57F; F163L; 1314N; S398W;	+	+	nd
107/108	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	M31S; W57F; F163L;	+	+	nd
109/110	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K1631; V168K; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398W; C424A; F427Y; E451D;	M31S; W57F; L163I; V168K; E315G; A346L; S398W; E451D;	+	+	nd

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Actividad ^a _b	Estabilidad ^b	Tolerancia del producto ^{e,c,d}
111/11 2	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; I314N; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398V; C424A; F427Y;	Y14V; M31S; W57F; F163L; I314N; A346L; S398V;	+	+	nd
113/11 4	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398L; C424A; F427Y;	M31S; W57F; L163I; E315G; A346L; S398L;	+	+	nd
115/11 6	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398V; C424A; F427Y; E451D;	M31S; L163I; E315G; A346L; S398V; E451D;	+	+	nd
117/11 8	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398W; C424A; F427Y; E451D;	M31S; W57F; L163I; E315G; A346L; S398W; E451D;	+	+	nd
119/12 0	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398V; C424A; F427Y;	M31S; W57F; L163I; E315G; A346L; S398V;	188, 190, 193, 194, 196,	+	nd
121/12 2	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398L; C424A; F427Y;	W57F; F163L; A346L; S398L;	Nd	+	+
123/12 4	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V168K; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; I314N; E315G; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398V; C424A; F427Y;	W57F; F163L; V168K; I314N; E315G; A346L; S398V;	+	+	++
125/12 6	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398V; L423I; C424A; F427Y;	M31S; W57F; L163I; E315G; A346L; S398V; L423I;	+	+	nd

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Actividad ^a _b	Estabilidad ^b	Tolerancia del producto ^{e,c,d}
127/128	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; I314N; E315G; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398V; Q419S; C424A; F427Y;	M31S; W57F; F163L; I314N; E315G; A346L; S398V; Q419S;	+	+	nd
129/130	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; S400G; L417M; S420N; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; L163I; S284A; S400G; L417M; S420N;	Nd	nd	+
131/132	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; L173A; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; S400G; S420N; C424A; F427Y;	Y14V; F163L; L173A; S400G; S420N;	+	+	++
133/134	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; Y113L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424V; F427Y;	Y14V; Y113L; F163L; S284A; A424V;	+	+	++
135/136	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; R88L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324H; A383V; T391A; S400G; L417M; C424A; F427Y;	Y14V; R88L; F163L; G324H; S400G; L417M;	+	+	nd
137/138	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; W57F; F86Y; Y113L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; W57F; Y113L; F163L; S284A;	Nd	nd	+
139/140	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324G; T391A; S400G; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; F163L; S284A; V383A; S400G;	Nd	nd	++
141/142	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; Y113L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; T391A; C424V; F427Y;	Y14V; H26R; Y113L; F163L; V383A; A424V;	+	+	nd

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Actividad ^a _b	Estabilidad ^b	Tolerancia del producto ^{e,c,d}
143/144	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; R88L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	R88L; F163L;	+	+	#; VALOR!
145/146	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; N148Q; V153S; K163I; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324G; T391A; S400G; S420N; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; N148Q; L163I; S284A; V383A; S400G; S420N;	Nd	+	++
147/148	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; V33T; N45H; W57F; F86Y; Y113L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	Y14V; V33T; W57F; Y113L; F163L;	+	+	nd
149/150	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; N45H; W57F; F86Y; R88L; Y113L; A133R; R146L; W147K; N148Q; V153S; K163I; L173A; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; T391A; S400G; C424A; F427Y;	Y14V; W57F; R88L; Y113L; N148Q; L163I; L173A; V383A; S400G;	Nd	+	nd
151/152	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	W57F; F163L;	Nd	+	+
153/154	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324H; A383V; T391A; S400G; C424A; F427Y;	Y14V; H26R; F163L; S284A; G324H; S400G;	+	+	nd

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Actividad ^a ^b	Estabilidad ^b	Tolerancia del producto ^{c,d}
^aCondición del ensayo HTP 1: Las células cultivadas en placas de 96 pocillos se lisaron con 200 ul de Tampón de Lisis (lisozima 1 mg/ml, sulfato de polimixina B 0.5 mg/ml, PLP 1 mM, trietanolamina (TEA) 0.1 M, pH 7.0). Las condiciones de reacción comprendieron: 10 g/l (44.4 mM) del Compuesto (IA); piridoxal-5-fosfato (PLP) 1 mM; isopropilamina (IPM) 2 M, pH 7.0; trietanolamina (TEA) 100 mM, pH 7.0; PEG 200 al 5 % v/v; 10 ul de lisado; y 50 °C durante 24 h. ^bCondición del ensayo HTP 2: Las células cultivadas en placas de 96 pocillos se lisaron con 400 ul de Tampón de Lisis (lisozima 1 mg/ml, sulfato de polimixina B 0.5 mg/ml, PLP 1 mM, trietanolamina (TEA) 0.1 M, pH 7.0). Las condiciones de reacción comprendieron: 10 g/l (44.4 mM) del Compuesto (IA); piridoxal-5-fosfato (PLP) 1 mM; isopropilamina (IPM) 2 M, pH 7.0; trietanolamina (TEA) 100 mM, pH 7.0; PEG 200 al 5 % v/v; 10 ul de lisado; y 50 °C durante 24 h. ^cCondiciones del ensayo de estabilidad: 10 g/l (44.4 mM) del compuesto (IA); piridoxal-5-fosfato (PLP) 1 mM; isopropilamina (IPM) 2 M, pH 7.0; trietanolamina (TEA) 100 mM, pH 7.0; PEG 200 al 5 % v/v; 10 ul de lisado (preparado de acuerdo con las Condiciones del Ensayo HTP 1 o 2); y 55 °C durante 24 h. Los lisados se prepararon de acuerdo con la Condición del ensayo HTP 1 (para la SEQ ID NO: 4-90) o Condición del ensayo HTP 2 (para la SEQ ID NO: 92-230). ^dCondición del Ensayo de Inhibición del Producto 1: 10 g/l (44.4 mM) del Compuesto (IA); 14 g/l del Compuesto (IIA); piridoxal-5-fosfato (PLP) 1 mM; isopropilamina (IPM) 2 M, pH 7.0; trietanolamina (TEA) 100 mM, pH 7.0; PEG 200 al 5 % v/v; 10 ul de lisado; y 50 °C. Los lisados se prepararon de acuerdo con la Condición del ensayo HTP 1. ^eCondición del Ensayo de Inhibición del Producto 2: 10 g/l (44.4 mM) del Compuesto (IA); 16 g/l del Compuesto (IIA); piridoxal-5-fosfato (PLP) 1 mM; isopropilamina (IPM) 2 M, pH 7.0; trietanolamina (TEA) 100 mM, pH 7.0; PEG 200 al 5 % v/v; 10 ul de lisado; y 50 °C. Los lisados se prepararon de acuerdo con la Condición del ensayo HTP 2. nd: no determinado					

Tabla 2B: Polipéptidos modificados y mejoras de enzima relativas utilizando preparaciones de matraz agitado y DSP

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con el tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Matraz agitado		DSP	
			% ee	Actividad ^a	% ee	Actividad ^b
1/2	n/a		nd	Nd	nd	nd
3/4	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163F; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y		"Control "	"Control "	"Control "	"Control "
5/6	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y;	F163L	99.7	+	nd	nd
7/8	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163I; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y	F163I	99.5	+	nd	nd
45/46	A9T; Y14V; G18A; D21H; H26R; V31M; N45H; W57F; F86Y; R88L; Y113L; A133R; R146L; W147K; N148Q; V153S; K163I; V177L; R211K;	Y14V; H26R; W57F; R88L; Y113L; N148Q; L163I	99.6	+	99.4	+

SEQ ID NO:	Mutaciones activas (en relación con el tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2)	Mutaciones activas (en relación con SEQ ID NO: 4)	Matraz agitado		DSP	
			% ee	Actividad ^a	% ee	Actividad ^b
	P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y					
99/100	A9T; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163I; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; E315G; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398L; Q419S; C424A; F427Y	M31S; W57F; L163I; E315G; A346L; S398L; Q419S	99.8	+	nd	nd
111/112	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31S; N45H; W57F; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; I314N; P318D; A323T; S324G; A346L; A383V; T391A; S398V; C424A; F427Y	Y14V; M31S; W57F; F163L; I314N; A346L; S398V	99.7	+	nd	nd
133/134	A9T; Y14V; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; Y113L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; S284A; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424V; F427Y	Y14V; Y113L; F163L; S284A; A424V	nd	Nd	99.8	+
143/144	A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; R88L; A133R; R146L; W147K; V153S; K163L; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y	R88L; F163L	99	Nd	nd	nd
^a Condiciones del Ensayo en Matraz Agitado: 25 g/l (o 50 o 100 g/l) del Compuesto (IA); piridoxal-5-fosfato (PLP) 1 mM; isopropilamina (IPM) 2 M, pH 7.0; 5 % v/v de PEG200; trietanolamina (TEA) 100 mM, pH 7.0; 2 g/l de proteína de preparación en matraz agitado que contiene transaminasas; y 50 °C durante un tiempo de reacción de 24 h. ^b Condiciones del Ensayo DSP: 25 g/l (o 50 o 100 g/l) de compuesto (IA); piridoxal-5-fosfato (PLP) 1 mM; isopropilamina (IPM) 2 M, pH 7; 5 % v/v de PEG200; trietanolamina (TEA) 100 mM, pH 7; 2 g/l de proteína de una preparación de DSP que contiene transaminasas; y 50 °C durante un tiempo de reacción de 24 h.						

A partir de una inspección de los polipéptidos de ejemplo útiles en los métodos de la presente divulgación (que no se reivindican, pero los compuestos de la invención pueden encontrar uso), las mejoras en las propiedades enzimáticas están asociadas con diferencias de residuos en comparación con la SEQ ID NO: 4. en las posiciones de residuos X14; X26; X31; X33; X41; X47; X57; X70; X86; X88; X107; X113; X132; X148; X163; X168; X173; X203; X250; X284; X314; X315; X324; X346; X395; X398; X400; X417; X419; X420; X423; X424; X448; y X451. Las diferencias de residuo específicas en cada una de estas posiciones que se asocian con las propiedades mejoradas incluyen: X14V; X26R; X31S; X33T; X41L; X47N; X57F; X57Y; X70A; X86D; X88A; X88L; X107P; X113L; X113V; X132F; X148Q; X148R; X163I; X163L; X163R; X163V; X168K; X168S; X173A; X203S; X250A; X284A; X314N; X315G; X324H; X346L; X395P; X398L; X398V; X398W; X400G; X417M; X419S; X420N; X423I; X424V; X448E; y X451D.

De acuerdo con lo anterior, el polipéptido de transaminasa modificado útil en los métodos de la presente divulgación es capaz de convertir el Compuesto de sustrato (IA), 1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-ona, al Compuesto de

producto (IIA), (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina con propiedades mejoradas en comparación con la SEQ ID NO: 4, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 2 y una o más diferencias de residuos en comparación con la SEQ ID NO: 4 en las posiciones de residuos seleccionadas de: X14; X26; X31; X33; X41; X47; X57; X70; X86; X88; X107; X132; X148; X163; X168; X173; X203; X250; X284; X314; X315; X324; X346; X395; X398; X400; X417; X419; X423; X448; y X451, donde las diferencias del residuo en las posiciones del residuo X31; X57; X86; X163; X168; X314; X324; X398; y X417 se seleccionan de: X31S; X57Y; X86D; X163I; X163L; X163R; X163V; X168S; X314N; X324H; X398L; X398V; X398W; y X417M.

El polipéptido de transaminasa modificado útil en los métodos divulgados de forma instantánea es capaz de convertir el Compuesto de sustrato (IA) en el Compuesto de producto (IIA) con propiedades mejoradas en comparación con la SEQ ID NO: 4, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 4 y una o más diferencias de residuos en comparación con la SEQ ID NO: 4 en las posiciones de residuos seleccionadas de: X14; X26; X31; X33; X41; X47; X57; X70; X86; X88; X107; X132; X148; X163; X168; X173; X203; X250; X284; X314; X315; X324; X346; X395; X398; X400; X417; X419; X423; X448; y X451, en las que las diferencias del residuo en las posiciones del residuo X31; X57; X86; X163; X168; X314; X324; X398; y X417 se seleccionan de: X31S; X57Y; X86D; X163I; X163L; X163R; X163V; X168S; X314N; X324H; X398L; X398V; X398W; y X417M. Los polipéptidos de transaminasas modificados son capaces de llevar a cabo la conversión con las enantioselectividades descritas anteriormente, por ejemplo, $\geq 90\%$ ee.

El polipéptido de transaminasa útil en los métodos divulgados de forma instantánea es capaz de convertir el Compuesto de sustrato (IA) al Compuesto de producto (IIA) con propiedades mejoradas en comparación con la SEQ ID NO: 4, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad con una secuencia de referencia seleccionada de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, y 154, y una o más diferencias de residuos en comparación con la SEQ ID NO: 4 en las posiciones de residuos seleccionadas de: X14; X26; X31; X33; X41; X47; X57; X70; X86; X88; X107; X132; X148; X163; X168; X173; X203; X250; X284; X314; X315; X324; X346; X395; X398; X400; X417; X419; X423; X448; y X451, donde las diferencias del residuo en las posiciones del residuo X31; X57; X86; X163; X168; X314; X324; X398; y X417 se seleccionan de: X31S; X57Y; X86D; X163I; X163L; X163R; X163V; X168S; X314N; X324H; X398L; X398V; X398W; y X417M. La secuencia de referencia se puede seleccionar de la SEQ ID NO: 4, 8, 14, 16, 132, 134 y 146. La secuencia de referencia puede ser la SEQ ID NO: 4. La secuencia de referencia puede ser la SEQ ID NO: 8. La secuencia de referencia puede ser la SEQ ID NO: 134. La secuencia de referencia puede ser la SEQ ID NO: 146.

El polipéptido de transaminasa capaz de convertir el Compuesto de sustrato (IA) al Compuesto de producto (IIA) con propiedades mejoradas en comparación con la SEQ ID NO: 4, puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, y 154, y que tiene una o más diferencias de residuos en comparación con la SEQ ID NO: 4 en las posiciones de residuos seleccionadas de: X14; X26; X31; X33; X41; X47; X57; X70; X86; X88; X107; X132; X148; X163; X168; X173; X203; X250; X284; X314; X315; X324; X346; X395; X398; X400; X417; X419; X423; X448; y X451, donde las diferencias del residuo en las posiciones del residuo X31; X57; X86; X163; X168; X314; X324; X398; y X417 se seleccionan de: X31S; X57Y; X86D; X163I; X163L; X163R; X163V; X168S; X314N; X324H; X398L; X398V; X398W; y X417M. La secuencia de aminoácidos se puede seleccionar de la SEQ ID NO: 4, 8, 14, 16, 132, 134 y 146. La secuencia de aminoácidos puede ser la SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos puede ser la SEQ ID NO: 8. La secuencia de aminoácidos puede ser la SEQ ID NO: 134. La secuencia de aminoácidos puede ser la SEQ ID NO: 146.

El polipéptido de transaminasa modificado puede ser capaz de convertir el Compuesto de sustrato (IA) al Compuesto de producto (IIA) con al menos 1.2 veces la actividad con respecto a la SEQ ID NO: 4 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 22, 24, 28, 30, 32, 48, 52, 56, 62, 64, 66, 68, 86, 88, 90, 92, 98, 100, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 124, 126, 128, 132, 134, 136, 142, 144, 148, y 154.

El polipéptido de transaminasa modificado puede ser capaz de convertir el Compuesto de sustrato (IA) al Compuesto de producto (IIA) con al menos 5 veces la actividad con respecto a la SEQ ID NO: 4 y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más diferencias de residuos seleccionados de: X14V, X26R; X33T; X88A/L; X163I/L; y X284A.

En algunas realizaciones, el polipéptido de transaminasa modificado útil en los métodos divulgados de forma instantánea es capaz de convertir el Compuesto de sustrato (IA) al Compuesto de producto (IIA) con al menos 5 veces la actividad con respecto a la SEQ ID NO: 4 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: la

SEQ ID NO: 6, 8, 10, 14, 16, 22, 24, 28, 30, 32, 48, 52, 56, 62, 64, 86, 88, 90, 92, 98, 100, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 124, 126, 128, 132, 134, 136, 142, 144, 148, y 154.

El polipéptido de transaminasa modificado puede tener al menos 1.2 veces, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o más refractariedad a la inhibición por 1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina, en particular (S)-1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina, en comparación con el polipéptido representado por la SEQ ID NO: 4 en la conversión del Compuesto (IA) al Compuesto (IIA). Generalmente, el aumento de la refractariedad o la resistencia a la inhibición por parte del compuesto de producto se puede medir bajo condiciones de ensayo HTP en presencia de 14 g/l o 16 g/l del Compuesto (IIA), como se describe en la Tabla 2A y 2B y los Ejemplos. El polipéptido de transaminasa modificado que tiene al menos 1.2 veces o más refractariedad a la inhibición por 1-(1H-5-fluoro-6-cloro-indol-3-il)propan-2-amina puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una o más diferencias de residuos en comparación con la SEQ ID NO: 4 seleccionada de: X26R; X70A; X86D; X88A/L; X132F; X163L; X315G; X395P; X398L; y X419S.

El polipéptido de transaminasa modificado con propiedades mejoradas en la conversión del Compuesto (IA) al Compuesto (IIA) puede tener una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, y 154.

La transaminasa modificada capaz de convertir el Compuesto (IA) en Compuesto (IIA) bajo condiciones de reacción adecuadas, puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con una de la SEQ ID NO: 66, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, y 154, y las diferencias de residuos de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 4 presente en cualquiera de la SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, y 154, cómo se proporciona en las Tablas 2A y 2B.

Los polipéptidos modificados pueden estar en diversas formas, por ejemplo, tales como una preparación aislada, como una enzima sustancialmente purificada, células completas transformadas con gen(es) que codifican la enzima y/o como extractos celulares y/o lisados de dichas células. Las enzimas se pueden liofilizar, secar por aspersión, precipitar o estar en forma de una pasta cruda, como se discute a continuación.

Los polipéptidos de transaminasas se pueden unir a un sustrato físico. El polipéptido de transaminasa se puede unir de forma no covalente o covalente a un sustrato físico de tal manera que retenga su actividad mejorada, estereoselectividad, tolerancia al producto, estabilidad y/u otras propiedades mejoradas con respecto al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 4. Los polipéptidos inmovilizados pueden facilitar la conversión biocatalítica de los sustratos de cetona adecuados, por ejemplo, el Compuesto (IA) o análogos estructurales del mismo, al producto de amina correspondiente, por ejemplo, el Compuesto (IIA) o los análogos estructurales correspondientes, y una vez completada la reacción se pueden retener fácilmente (por ejemplo, al retener perlas sobre las que se inmoviliza el polipéptido) y luego reutilizarlas o reciclarlas en reacciones posteriores. Dichos procesos de enzimas inmovilizadas permiten una mayor eficiencia y reducción de costes. Los métodos de inmovilización de enzimas son bien conocidos en la técnica. Varios métodos de conjugación a sustratos, por ejemplo, membranas, perlas, vidrio, etc. se describen, entre otros, en Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Second Edition, Academic Press; (2008), and *Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods*, In *Methods in Molecular Biology*, C.M. Niemeyer ed., Humana Press (2004).

Polinucleótidos que codifican transaminasas modificadas, vectores de expresión y células huésped (que no se reivindican)

La presente divulgación proporciona polinucleótidos que codifican los polipéptidos de transaminasas modificados descritos en el presente documento. Los polinucleótidos se pueden ligar operativamente a una o más secuencias reguladoras heterólogas que controlan la expresión génica para crear un polinucleótido recombinante capaz de expresar el polipéptido. Se pueden introducir construcciones de expresión que contienen un polinucleótido heterólogo que codifica la transaminasa modificada en células huésped apropiadas para expresar el polipéptido de transaminasa correspondiente.

Como resultará evidente para el experto en la técnica, la disponibilidad de una secuencia de proteínas y el conocimiento de los codones correspondientes a los diversos aminoácidos proporcionan una descripción de todos los polinucleótidos capaces de codificar los polipéptidos en cuestión. La degeneración del código genético, donde los mismos aminoácidos están codificados por codones alternativos o sinónimos, permite que se produzca una cantidad extremadamente grande de ácidos nucleicos, todos los cuales codifican las enzimas de transaminasas mejoradas. Por lo tanto, teniendo conocimiento de una secuencia de aminoácidos particular, aquellos expertos en la técnica

podrían producir cualquier número de ácidos nucleicos diferentes simplemente al modificar la secuencia de uno o más codones de una manera que no cambie la secuencia de aminoácidos de la proteína. En este sentido, la presente divulgación contempla específicamente todas y cada una de las variaciones posibles de polinucleótidos que podrían realizarse codificando los polipéptidos descritos en el presente documento al seleccionar combinaciones basadas en las posibles elecciones de codones, y dichas variaciones se deben considerar divulgadas específicamente para cualquier polipéptido descrito en el presente documento, que incluyen las secuencias de aminoácidos presentadas en las Tablas 2A y 2B, y divulgadas en el listado de secuencias como SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, y 154.

Los codones se seleccionan preferiblemente para que se ajusten a la célula huésped en la que se produce la proteína. Por ejemplo, los codones preferidos utilizados en bacterias se utilizan para expresar el gen en bacterias; los codones preferidos utilizados en levadura se utilizan para la expresión en levadura; y los codones preferidos utilizados en mamíferos se utilizan para la expresión en células de mamíferos. No es necesario reemplazar todos los codones para optimizar el uso de codones de las transaminasas, ya que la secuencia natural comprenderá codones preferidos y porque el uso de codones preferidos puede no ser necesario para todos los residuos de aminoácidos. De acuerdo con lo anterior, los polinucleótidos con codones optimizados que codifican las enzimas de transaminasas pueden contener codones preferidos en aproximadamente el 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más del 90 % de las posiciones de los codones de la región codificante de longitud completa.

Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de transaminasa mejorado se puede manipular de diversas maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos se pueden proporcionar como vectores de expresión en los que una o más secuencias de control están presentes para regular la expresión de los polinucleótidos y/o polipéptidos. La manipulación del polinucleótido aislado antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos y secuencias de ácidos nucleicos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica. Se proporciona orientación en Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; and *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. ed., Greene Pub. Associates, 1998, actualizaciones a 2006.

Los polipéptidos mejorados y los polinucleótidos correspondientes se pueden obtener utilizando métodos utilizados por aquellos expertos en la técnica. La secuencia de polinucleótidos parental que codifica el polipéptido de tipo silvestre de *Vibrio fluvialis* se describe en Shin et al., 2003, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61(5-6):463-471, y se divulgan métodos para generar polipéptidos de transaminasas modificados con estabilidad mejorada y propiedades de reconocimiento de sustrato en las publicaciones de solicitudes de patente WO2010081053 y US20100209981.

Cuando se conoce la secuencia del polipéptido modificado, los polinucleótidos que codifican la enzima se pueden preparar mediante métodos estándar en fase sólida, de acuerdo con métodos sintéticos conocidos. Se pueden sintetizar individualmente fragmentos de hasta aproximadamente 100 bases y luego unirse (por ejemplo, mediante métodos de ligación enzimáticos o químicos, o métodos mediados por polimerasa) para formar cualquier secuencia continua deseada. Por ejemplo, los polinucleótidos y oligonucleótidos de la divulgación se pueden preparar mediante síntesis química utilizando, por ejemplo, el método clásico de la fosforamidita descrito por Beaucage et al., 1981, *Tet Lett* 22:1859-69, o el método descrito por Matthes et al., 1984, *EMBO J.* 3:801-05, por ejemplo, como se practica normalmente en los métodos sintéticos automatizados. De acuerdo con el método de la fosforamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, purificado, hibridado, ligado y clonado en vectores apropiados. Además, esencialmente cualquier ácido nucleico se puede obtener a partir de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales.

De acuerdo con lo anterior, un método para preparar el polipéptido de transaminasas modificado puede comprender: (a) sintetizar un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, y 154 y que tiene una o más diferencias de residuo en comparación con la SEQ ID NO: 4 en las posiciones del residuo seleccionadas de: X14; X26; X31; X33; X41; X47; X57; X70; X86; X88; X107; X132; X148; X163; X168; X173; X203; X250; X284; X314; X315; X324; X346; X395; X398; X400; X417; X419; X423; X448; y X451, en las que las diferencias de residuo en las posiciones del residuo X31; X57; X86; X163; X168; X314; X324; X398; y X417 se seleccionan de: X31S; X57Y; X86D; X163I; X163L; X163R; X163V; X168S; X314N; X324H; X398L; X398V; X398W; y X417M; y (b) expresar el polipéptido de transaminasa codificado por el polinucleótido.

La transaminasa modificada expresada se puede medir para determinar la propiedad mejorada deseada, por ejemplo, actividad, enantioselectividad, estabilidad y tolerancia del producto, en la conversión del compuesto (IA) al Compuesto (IIA) por cualquiera de las condiciones de ensayo descritas en el presente documento.

Cualquiera de las enzimas de transaminasas modificadas expresadas en una célula huésped se puede recuperar de las células o del medio de cultivo utilizando una o más de las técnicas bien conocidas para la purificación de proteínas, que incluyen, entre otras, tratamiento con lisozima, sonicación, filtración, salado, ultracentrifugación y cromatografía. Soluciones adecuadas para la lisis y extracción de alta eficiencia de proteínas de bacterias, tales como *E. coli*, están disponibles comercialmente con el nombre comercial CellLytic B™ de Sigma-Aldrich de St. Louis MO.

Las técnicas cromatográficas para el aislamiento del polipéptido de transaminasa incluyen, entre otras, cromatografía de fase inversa, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel y cromatografía de afinidad. Las condiciones para purificar una enzima particular dependerán, en parte, de factores tales como carga neta, hidrofobicidad, hidrofiliidad, peso molecular, forma molecular, etc., y serán evidentes para aquellos expertos en la técnica.

Se pueden utilizar técnicas de afinidad para aislar las enzimas de transaminasas mejoradas. Para la purificación por cromatografía de afinidad, se puede utilizar cualquier anticuerpo que se una específicamente al polipéptido de transaminasa. Para la producción de anticuerpos, se pueden inmunizar diversos animales huéspedes, que incluyen, pero no se limitan a, conejos, ratones, ratas, etc., mediante inyección de un polipéptido de transaminasa o un fragmento del mismo. El polipéptido o fragmento de transaminasa se puede adherir a un portador adecuado, tal como BSA, por medio de un grupo funcional de cadena lateral o ligadores adheridos a un grupo funcional de cadena lateral. Se pueden utilizar varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, que incluyen, pero no se limitan a, geles minerales de Freund (completos e incompletos) tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilos Calmette Guérin) y *Corynebacterium parvum*.

Métodos de uso de enzimas de transaminasas modificadas (que no se reivindican, pero en los que también se pueden utilizar los compuestos reivindicados)

Las transaminasas descritas en el presente documento se pueden utilizar en un proceso para llevar a cabo reacciones de transaminasas en las que un grupo amino de un donador de amino se transfiere a un aceptor de amino, por ejemplo, sustrato cetona, para producir una amina. El uso de un aceptor de cetona proquiral puede dar como resultado la producción de una amina quiral en exceso enantiomérico. Generalmente, el proceso para realizar la reacción de transaminación comprende poner en contacto o incubar un donador de amino y un aceptor de amino con un polipéptido de transaminasa modificado de la divulgación bajo condiciones de reacción adecuadas para convertir el aceptor de amino en una amina.

Las transaminasas se pueden utilizar en la conversión del compuesto de sustrato de fórmula (I) al producto compuesto de fórmula (II). De acuerdo con lo anterior, un proceso para preparar el compuesto de fórmula (II) en exceso enantiomérico comprende poner en contacto el compuesto de fórmula (I) en presencia de un donador de amino bajo condiciones de reacción adecuadas con un polipéptido de transaminasa modificado descrito en el presente documento. En el proceso, el compuesto de fórmula (II) se puede formar en al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor exceso enantiomérico.

Para los procesos anteriores, se puede utilizar cualquiera de las transaminasas modificadas descritas en el presente documento. A modo de ejemplo y sin limitación, el proceso puede utilizar un polipéptido de transaminasas modificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad con una secuencia de referencia seleccionada de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, y 154, y una o más diferencias de residuos en comparación con la SEQ ID NO: 4 en las posiciones del residuo seleccionadas de: X14; X26; X31; X33; X41; X47; X57; X70; X86; X88; X107; X132; X148; X163; X168; X173; X203; X250; X284; X314; X315; X324; X346; X395; X398; X400; X417; X419; X423; X448; y X451, en las que las diferencias de residuo en las posiciones del residuo X31; X57; X86; X163; X168; X314; X324; X398; y X417 se seleccionan de: X31S; X57Y; X86D; X163I; X163L; X163R; X163V; X168S; X314N; X324H; X398L; X398V; X398W; y X417M. La secuencia de referencia se puede seleccionar de la SEQ ID NO: 4, 8, 14, 16, 132, 134 y 146.

La secuencia de referencia puede ser la SEQ ID NO: 4. La secuencia de referencia puede ser la SEQ ID NO: 8. La secuencia de referencia puede ser la SEQ ID NO: 134. La secuencia de referencia puede ser la SEQ ID NO: 146.

Las transaminasas de ejemplo capaces de llevar a cabo los procesos del presente documento pueden ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, y 154. En las descripciones del presente documento se proporciona orientación sobre la elección y el uso de las transaminasas modificadas, por ejemplo la Tabla 2 y los Ejemplos.

En los Ejemplos se ilustran diversos rangos de condiciones de reacción adecuadas que se pueden utilizar en los procesos, que incluyen, pero no se limitan a, rangos de donador de amino, pH, temperatura, tampón, sistema de solvente, carga de sustrato, carga de polipéptido, carga de cofactor, presión, y tiempo de reacción. Condiciones de reacción adecuadas adicionales para llevar a cabo el proceso para la conversión biocatalítica de compuestos de sustrato en compuestos de producto utilizando un polipéptido de transaminasa modificado en el presente documento descrito se pueden optimizar fácilmente en vista de la orientación proporcionada en el presente documento mediante experimentación de rutina que incluye, pero no se limita a, poner en contacto el polipéptido de transaminasa modificado y el compuesto de sustrato bajo condiciones de reacción experimentales de concentración, pH, temperatura, condiciones de solvente y detectar el compuesto de producto.

El polipéptido de transaminasa puede utilizar un donador de amino para formar los compuestos de producto. El donador de amino en las condiciones de reacción se puede seleccionar entre isopropilamina (también denominada en el presente documento "IPM"), putrescina, L-lisina, α -fenetilamina, D-alanina, L-alanina o D,L-alanina, o D,L-ornitina. El donador de amino se puede seleccionar del grupo que consiste en IPM, putrescina, L-lisina, D- o L-alanina. El donador de amino puede ser IPM. Las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender el donador de amino, en particular IPM, presente en una concentración de al menos aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3.0 M, 0.2 a aproximadamente 2.5 M, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2 M o aproximadamente 1 a aproximadamente 2 M. El donador de amino puede estar presente en una concentración de aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1, 1.5, 2, 2.5 o 3 M. Se pueden utilizar concentraciones más altas de donador de amino, por ejemplo, IPM, para desplazar el equilibrio hacia la formación de productos de amina.

Las condiciones de reacción adecuadas que utilizan los polipéptidos de transaminasas modificados también comprenden normalmente un cofactor. Los cofactores útiles en los procesos que utilizan las enzimas de transaminasas modificadas incluyen, pero no se limitan a, piridoxal-5'-fosfato (también conocido como piridoxal-fosfato, PLP, P5P), piridoxina (PN), piridoxal (PL), piridoxamina (PM), y sus homólogos fosforilados; fosfato de piridoxina (PNP) y fosfato de piridoxamina (PMP). El cofactor PLP puede estar presente de forma natural en el extracto celular y no es necesario complementarlo. En algunas realizaciones de los métodos, las condiciones de reacción adecuadas comprenden cofactor agregado a la mezcla de reacción enzimática, por ejemplo, cuando se utiliza enzima de transaminasa parcialmente purificada o purificada. Las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender la presencia de un cofactor seleccionado de PLP, PN, PL, PM, PNP y PMP, a una concentración de aproximadamente 0.1 g/l a aproximadamente 10 g/l, aproximadamente 0.2 g/l a aproximadamente 5 g/l, aproximadamente 0.5 g/l a aproximadamente 2.5 g/l. Las condiciones de reacción pueden comprender una concentración de PLP de aproximadamente 0.1 g/l o menos, 0.2 g/l o menos, 0.5 g/l o menos, 1 g/l o menos, 2.5 g/l o menos, 5 g/l o menos, o 10 g/l o menos. El cofactor se puede agregar al comienzo de la reacción y/o se agrega cofactor adicional durante la reacción.

El compuesto de sustrato en las mezclas de reacción se puede variar, teniendo en cuenta, por ejemplo, la cantidad deseada de compuesto de producto, el efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática, estabilidad de la enzima bajo las condiciones de reacción y el porcentaje de conversión de sustrato en producto. Las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender una carga de compuesto de sustrato de al menos aproximadamente 0.5 a aproximadamente 200 g/l, 1 a aproximadamente 200 g/l, 5 a aproximadamente 150 g/l, aproximadamente 10 a aproximadamente 100 g/l, 20 a aproximadamente 100 g/l o aproximadamente 50 a aproximadamente 100 g/l. Las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender una carga de compuesto de sustrato de al menos aproximadamente 0.5 g/l, al menos aproximadamente 1 g/l, al menos aproximadamente 5 g/l, al menos aproximadamente 10 g/l, al menos aproximadamente 15 g/l, al menos aproximadamente 20 g/l, al menos aproximadamente 30 g/l, al menos aproximadamente 50 g/l, al menos aproximadamente 75 g/l, al menos aproximadamente 100 g/l, al menos aproximadamente 150 g/l o al menos aproximadamente 200 g/l, o incluso mayor.

La actividad mejorada y/o estereoselectividad de los polipéptidos de transaminasas modificados divulgados en el presente documento proporciona procesos en los que se puede lograr un mayor porcentaje de conversión con concentraciones más bajas del polipéptido modificado. En algunas realizaciones del proceso, las condiciones de reacción adecuadas comprenden una concentración de polipéptido modificado de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50 g/l; aproximadamente 0.05 a aproximadamente 50 g/l; aproximadamente 0.1 a aproximadamente 40 g/l; aproximadamente 1 a aproximadamente 40 g/l; aproximadamente 2 a aproximadamente 40 g/l; aproximadamente 5 a aproximadamente 40 g/l; aproximadamente 5 a aproximadamente 30 g/l; aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 g/l; aproximadamente 0.5 a aproximadamente 10 g/l; aproximadamente 1 a aproximadamente 10 g/l; aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 g/l; aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5 g/l; o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 g/l. El polipéptido de transaminasa tiene una concentración de aproximadamente 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, o 50 g/l.

Durante el curso de las reacciones de transaminación, el pH de la mezcla de reacción puede cambiar. El pH de la mezcla de reacción se puede mantener a un pH deseado o dentro de un rango de pH deseado. Esto se puede hacer mediante la adición de un ácido o una base, antes y/o durante el curso de la reacción. Alternativamente, el pH se puede controlar al utilizar un tampón. De acuerdo con lo anterior, la condición de reacción puede comprender un tampón. En la técnica se conocen tampones adecuados para mantener los rangos de pH deseados e incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, tampón de borato, carbonato, fosfato, trietanolamina y similares. El tampón puede ser

borato. En algunas realizaciones del proceso, las condiciones de reacción adecuadas comprenden una solución tampón de trietanolamina, donde la concentración de trietanolamina es desde aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 0.4 M, 0.05 a aproximadamente 0.4 M, 0.1 a aproximadamente 0.3 M, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.2 M. Las condiciones de reacción pueden comprender una concentración de trietanolamina de aproximadamente 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.07, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.2, 0.3, o 0.4 M. Las condiciones de reacción pueden comprender agua como un solvente adecuado sin tampón presente.

En el proceso, las condiciones de reacción pueden comprender un pH adecuado. El pH deseado o el rango de pH deseado se puede mantener mediante el uso de un ácido o base, un tampón apropiado o una combinación de tampón y adición de ácido o base. El pH de la mezcla de reacción se puede controlar antes y/o durante el curso de la reacción. Las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender un pH de la solución que comprende un pH desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 12, pH desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 10, pH desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8, pH desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 10, pH desde aproximadamente 7 hasta a aproximadamente 9, o pH desde aproximadamente 7 hasta a aproximadamente 8. Las condiciones de reacción pueden comprender un pH de la solución de aproximadamente 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5 o 12.

En los procesos en el presente documento, se puede utilizar una temperatura adecuada para las condiciones de reacción, por ejemplo, teniendo en cuenta el aumento de la tasa de reacción a temperaturas más altas y la actividad de la enzima durante el período de tiempo de reacción. Por ejemplo, los polipéptidos modificados de la presente divulgación tienen una mayor estabilidad con respecto al polipéptido de transaminasa de origen natural, por ejemplo, el polipéptido de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2, que permiten que los polipéptidos modificados se utilicen a temperaturas más altas para aumentar las tasas de conversión y mejorar las características de solubilidad del sustrato para la reacción. De acuerdo con lo anterior, las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender una temperatura de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 70 °C, aproximadamente 10 °C a aproximadamente 65 °C, aproximadamente 15 °C a aproximadamente 60 °C, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 60 °C, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55 °C, aproximadamente 30 °C a aproximadamente 55 °C, o aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C. Las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender una temperatura de aproximadamente 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, o 70 °C. La temperatura durante la reacción enzimática se puede mantener a una temperatura durante todo el curso de la reacción. La temperatura durante la reacción enzimática se puede ajustar según un perfil de temperatura durante el curso de la reacción.

Los procesos de la divulgación generalmente se llevan a cabo en un solvente. Los solventes adecuados incluyen agua, soluciones tampón acuosas, solventes orgánicos, solventes poliméricos y/o sistemas de cosolventes, que generalmente comprenden solventes acuosos, solventes orgánicos y/o solventes poliméricos. El solvente acuoso (agua o sistema de cosolvente acuoso) puede tener un pH tamponado o no estar tamponado. Los procesos que utilizan los polipéptidos de transaminasas modificados generalmente se llevan a cabo en un sistema de cosolvente acuoso que comprende un solvente orgánico (por ejemplo, etanol, isopropanol (IPA), sulfóxido de dimetilo (DMSO), acetato de etilo, acetato de butilo, 1-octanol, heptano, octano, éter de metil t-butilo (MTBE), tolueno y similares), solventes iónicos o polares (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1 etil 4 metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1 butil 3 metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1 butil 3 metilimidazolio, glicerol, polietilenglicol y similares). El cosolvente puede ser un solvente polar, tal como un poliol, dimetilsulfóxido, DMSO o alcohol inferior. El componente cosolvente no acuoso de un sistema de cosolvente acuoso puede ser miscible con el componente acuoso, proporcionando una única fase líquida, o puede ser parcialmente miscible o inmiscible con el componente acuoso, proporcionando dos fases líquidas. Los sistemas de cosolventes acuosos de ejemplo pueden comprender agua y uno o más cosolventes seleccionados de un solvente orgánico, solvente polar y solvente poliol. En general, el componente cosolvente de un sistema de cosolvente acuoso se elige de tal manera que no inactive adversamente la enzima de transaminasa bajo las condiciones de reacción. Los sistemas de cosolventes apropiados se pueden identificar fácilmente al medir la actividad enzimática de la enzima de transaminasa modificada especificada con un sustrato de interés definido en el sistema solvente candidato, utilizando un ensayo de actividad enzimática, tales como aquellos descritos en el presente documento.

En el proceso, las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender un cosolvente acuoso, donde el cosolvente comprende un solvente poliol, particularmente glicoles. Ejemplos de solventes de poliol adecuados incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, polietilenglicol, éter de polietilenglicol metilo, éter de dietilenglicol dimetilo, éter de trietilenglicol dimetilo y polipropilenglicol. El cosolvente acuoso puede comprender polietilenglicol, que está disponible en diferentes pesos moleculares. Particularmente útiles son los glicoles de menor peso molecular, tales como PEG200 a PEG600. De acuerdo con lo anterior, el cosolvente acuoso puede comprender PEG200 de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % v/v; aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % v/v; aproximadamente 2 % a aproximadamente 40 % v/v; aproximadamente 5 % a aproximadamente 40 % v/v; 2 % a aproximadamente 30 % v/v; 5 % a aproximadamente 30 % v/v; 1 a aproximadamente 20 % v/v; aproximadamente 2 % a aproximadamente 20 % v/v; aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % v/v; aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % v/v; aproximadamente 2 % a aproximadamente 10 % v/v. Las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender un cosolvente acuoso que comprende PEG200 en aproximadamente 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 35 % o aproximadamente 40 % v/v.

En el proceso, las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender un cosolvente acuoso, donde el cosolvente comprende DMSO en aproximadamente 1 % a aproximadamente 80 % (v/v), aproximadamente 1 a aproximadamente 70 % (v/v), aproximadamente 2 % a aproximadamente 60 % (v/v), aproximadamente 5 % a aproximadamente 40 % (v/v), 10 % a aproximadamente 40 % (v/v), 10 % a aproximadamente 30 % (v/v), o aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 % (v/v). En el proceso, las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender un cosolvente acuoso que comprende DMSO al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % (v/v).

Las cantidades de reactivos utilizados en la reacción de transaminación variarán generalmente dependiendo de las cantidades de producto deseadas y, concomitantemente, de la cantidad de sustrato de transaminasa empleada. Aquellos expertos con conocimientos básicos en la técnica entenderán fácilmente cómo variar estas cantidades para adaptarlas al nivel deseado de productividad y escala de producción.

El orden de adición de los reactivos puede no ser crítico. Los reactivos se pueden agregar juntos al mismo tiempo a un solvente (por ejemplo, solvente monofásico, sistema de cosolvente acuoso bifásico y similares), o alternatively, algunos de los reactivos se pueden agregar por separado y algunos juntos en diferentes puntos de tiempo. Por ejemplo, el cofactor, la transaminasa y el sustrato de transaminasa se pueden agregar primero al solvente.

Los reactivos sólidos (por ejemplo, enzima, sales, etc.) se pueden proporcionar a la reacción en una variedad de formas diferentes, que incluyen el polvo (por ejemplo, liofilizados, secados por aspersión y similares), solución, emulsión, suspensión y similares. Los reactivos se pueden liofilizar o secar por aspersión fácilmente utilizando métodos y equipos que son conocidos por aquellos expertos con conocimientos básicos en la técnica. Por ejemplo, la solución de proteína se puede congelar a -80 °C en pequeñas alícuotas y luego agregar a una cámara de liofilización previamente enfriada, seguido de la aplicación de vacío.

Para mejorar la eficiencia de la mezcla cuando se utiliza un sistema de cosolvente acuoso, la transaminasa y el cofactor se pueden agregar y mezclar primero en la fase acuosa. A continuación se puede agregar y mezclar la fase orgánica, seguida por la adición del sustrato de transaminasa. Alternativamente, el sustrato de transaminasa se puede mezclar previamente en la fase orgánica, antes de la adición a la fase acuosa.

Generalmente se deja que la reacción de transaminación continúe hasta que la conversión adicional del sustrato cetona en producto amina no cambie significativamente con el tiempo de reacción, por ejemplo, menos del 10 % del sustrato que se convierte, o menos del 5 % del sustrato que se convierte). Se puede dejar que la reacción continúe hasta que haya una conversión completa o casi completa de la cetona del sustrato en la amina del producto. La transformación de sustrato en producto se puede monitorizar utilizando métodos conocidos al detectar el sustrato y/o el producto. Los métodos adecuados incluyen cromatografía de gases, HPLC y similares. Los rendimientos de conversión del producto de amina quiral generado en la mezcla de reacción son generalmente mayores de aproximadamente 50 %, también pueden ser mayores de aproximadamente 60 %, también pueden ser mayores de aproximadamente 70 %, también pueden ser mayores de aproximadamente 80 %, también pueden ser mayores de 90 %, y a menudo son mayores de aproximadamente 97 %. Los métodos para preparar los compuestos de fórmula (II) que utilizan un polipéptido de transaminasa modificado bajo condiciones de reacción adecuadas puede dar como resultado al menos aproximadamente 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor conversión del sustrato de cetona, por ejemplo, compuesto de fórmula (I), al compuesto de producto de amina, por ejemplo, compuesto de fórmula (II) en aproximadamente 48 h o menos, en aproximadamente 36 h o menos, en aproximadamente 24 h o menos, o incluso menos tiempo.

En el proceso, las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender una carga de sustrato de compuesto de sustrato de al menos aproximadamente 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 100 g/l, o más, y en el que el método da como resultado al menos aproximadamente 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de conversión del compuesto de sustrato al compuesto de producto en aproximadamente 48 h o menos, en aproximadamente 36 h o menos, o en aproximadamente 24 h o menos.

Los polipéptidos de transaminasas modificados de la presente divulgación, cuando se utilizan en el proceso bajo condiciones de reacción adecuadas, dan como resultado un exceso enantiomérico de la amina quiral en al menos 97 %, 98 %, 99 %, 99.1 %, 99.2 %, 99.3 %, 99.4 %, 99.5 %, 99.6 %, 99.7 %, 99.8 %, o 99.9 % de e.e.

En los métodos para convertir un compuesto de sustrato en un compuesto de producto de amina utilizando los polipéptidos de transaminasa modificados, las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender una carga de sustrato inicial en la solución de reacción que luego se pone en contacto con el polipéptido. Esta solución de reacción se complementa además con un sustrato adicional de compuesto como una adición continua a lo largo del tiempo a una tasa de al menos aproximadamente 1 g/l/h, al menos aproximadamente 2 g/l/h, al menos aproximadamente 4 g/l/h, al menos aproximadamente 6 g/l/h, o mayor. Por lo tanto, de acuerdo con estas condiciones de reacción adecuadas, se agrega el polipéptido a una solución que tiene una carga de sustrato inicial de al menos aproximadamente 20 g/l, 30 g/l o 40 g/l. A esta adición de polipéptido le sigue luego la adición continua de sustrato adicional a la solución a una tasa de aproximadamente 2 g/l/h, 4 g/l/h, o 6 g/l/h hasta alcanzar una carga de sustrato final mucho mayor de se alcanza al menos aproximadamente 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 100 g/l, 150 g/l, 200 g/l o mayor. De acuerdo

con lo anterior, las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender la adición del polipéptido a una solución que tiene una carga de sustrato inicial de al menos aproximadamente 20 g/l, 30 g/l o 40 g/l seguida de la adición de sustrato adicional a la solución a una tasa de aproximadamente 2 g/l/h, 4 g/l/h, o 6 g/l/h hasta que se alcanza una carga final de sustrato de al menos aproximadamente 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 100 g/l o mayor. Esta condición de reacción de suplementación de sustrato permite lograr mayores cargas de sustrato mientras se mantienen tasas altas de conversión de sustrato de cetona a producto de amina de al menos aproximadamente 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor. El sustrato adicional agregado puede estar en una solución que comprende isopropilamina o acetato de isopropilamina en una concentración de al menos aproximadamente 0.5 M, al menos aproximadamente 1.0 M, al menos aproximadamente 2.5 M, al menos aproximadamente 5.0 M, al menos aproximadamente 7.5 M, al menos aproximadamente 10.0 M.

La reacción de transaminación utilizando un polipéptido de transaminasa modificado puede comprender las siguientes condiciones de reacción adecuadas: (a) carga de sustrato de aproximadamente 5 g/l a 200 g/l; (b) aproximadamente 0.1 a 50 g/l de polipéptido de transaminasas; (c) aproximadamente 0.1 a 4 M de isopropilamina (IPM); (d) aproximadamente 0.1 a 10 g/l de cofactor de fosfato de piridoxal (PLP); (e) pH de aproximadamente 6 a 9; y (f) temperatura de aproximadamente 30 a 60 °C.

La reacción de transaminación utilizando un polipéptido de transaminasa modificado puede comprender las siguientes condiciones de reacción adecuadas: (a) carga de sustrato de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 g/l; (b) aproximadamente 0.05 a 2 g/l de polipéptido de transaminasas; (c) aproximadamente del 1 al 10 % v/v de PEG200; (d) aproximadamente 1 a 2 M de isopropilamina (IPM); (e) aproximadamente 0.1 a 1 g/l de cofactor de fosfato de piridoxal (PLP); (f) aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5 M de trietanolamina (TEA); (g) pH de aproximadamente 6 a 8; y (h) temperatura de aproximadamente 45 a 55 °C.

La reacción de transaminación utilizando un polipéptido de transaminasa modificado puede comprender las siguientes condiciones de reacción adecuadas: (a) carga de sustrato de aproximadamente 25 a aproximadamente 100 g/l; (b) aproximadamente 0.5 a 10 g/l de polipéptido de transaminasas; (c) aproximadamente del 1 al 10 % v/v de PEG200; (d) aproximadamente 1 a 2 M de isopropilamina (IPM); (e) aproximadamente 0.1 a 1 g/l de cofactor de fosfato de piridoxal (PLP); (f) aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5 M de trietanolamina; (g) pH de aproximadamente 6 a 8; y (h) temperatura de aproximadamente 45 a 55 °C.

Los componentes de reacción adicionales o técnicas adicionales se llevan a cabo para complementar las condiciones de reacción. Estas pueden incluir tomar medidas para estabilizar o prevenir la inactivación de la enzima, reducir la inhibición del producto y cambiar el equilibrio de la reacción a formación de la amina del producto.

De acuerdo con lo anterior, en el proceso para preparar una amina, tal como una amina quiral, se pueden agregar cantidades adicionales del aceptor de amino (hasta la saturación) y/o el aceptor de amino (cetona) formado se puede eliminar continuamente de la mezcla de reacción. Por ejemplo, se puede utilizar un puente solvente o un sistema de cosolvente de dos fases para mover el producto de amina a una solución de extracción y, de este modo, reducir la inhibición por el producto de amina y también desplazar el equilibrio hacia la formación de producto (véase, por ejemplo, Yun and Kim, 2008, Biosci. Biotechnol. Biochem. 72(11):3030-3033).

Las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender la presencia del cofactor reducido, dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH), que puede actuar para limitar la inactivación de la enzima de transaminasa (véase por ejemplo, van Ophem et al., 1998, Biochemistry 37(9):2879-88). Cuando está presente NADH, se puede utilizar un sistema de regeneración de cofactor, tal como glucosa deshidrogenasa (GDH) y glucosa o formiato deshidrogenasa y formiato, para regenerar el NADH en el medio de reacción.

El proceso puede comprender además la eliminación del subproducto carbonilo formado a partir del donador del grupo amino cuando el grupo amino se transfiere al aceptor del grupo amino. Dicha eliminación in situ puede reducir la velocidad de la reacción inversa de tal manera que domine la reacción directa y luego se convierta más sustrato en producto. La eliminación del subproducto carbonilo se puede realizar de varias maneras. Cuando el donador del grupo amino es un aminoácido, tal como alanina, el subproducto carbonilo, un cetoácido, se puede eliminar mediante reacción con un peróxido (véase, por ejemplo, US 2008/0213845, incorporado en el presente documento como referencia). Los peróxidos que se pueden utilizar incluyen, entre otros, peróxido de hidrógeno; peroxiácidos (perácidos) tales como el ácido peracético ($\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$), ácido trifluoroperacético y ácido metacloroperoxibenzoico; peróxidos orgánicos tales como el peróxido de t-butilo ($(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$) u otros oxidantes selectivos tales como el perrutenato de tetrapropilamonio, MnO_2 , KMnO_4 , tetróxido de rutenio y compuestos relacionados. Alternativamente, la eliminación del piruvato se puede lograr mediante su reducción a lactato al emplear lactato deshidrogenasa para desviar el equilibrio al producto de amina (véase, por ejemplo, Koszelewski et al., 2008, Adv. Sin. Catal. 350: 2761-2766). La eliminación del piruvato también se puede lograr mediante su descarboxilación empleando piruvato descarboxilasa (véase, por ejemplo, Höhne et al., 2008, Chem BioChem 9: 363-365) o acetolactato sintasa (véase Yun and Kim, supra).

Alternativamente, cuando se utiliza un aminoácido como donador de grupo amino, el subproducto carbonilo cetoácido se puede reciclar nuevamente al aminoácido mediante reacción con amoníaco y NADH utilizando una enzima

deshidrogenasa apropiada, por ejemplo, aminoácido deshidrogenasa, en presencia de un donador de amina, tal como amoníaco, reponiendo de esta manera el donador de grupo amino.

Donde la elección del donador de amino da como resultado un subproducto carbonilo que tiene una presión de vapor mayor a la del agua (por ejemplo, un coproducto de bajo punto de ebullición tal como un compuesto de carbonilo orgánico volátil), el subproducto carbonilo se puede eliminar al rociar la solución de reacción con un gas no reactivo o al aplicar un vacío para disminuir la presión de reacción y eliminando el carbonilo. subproducto presente en la fase gaseosa. Un gas no reactivo es cualquier gas que no reacciona con los componentes de la reacción. Varios gases no reactivos incluyen nitrógeno y gases nobles (por ejemplo, gases inertes). El gas no reactivo puede ser gas nitrógeno. El donador de amino utilizado en el proceso puede ser isopropilamina (IPM), que forma el subproducto carbonilo acetona tras la transferencia del grupo amino al aceptor del grupo amino. La acetona se puede eliminar al rociar nitrógeno gaseoso o al aplicar vacío a la solución de reacción y eliminar la acetona de la fase gaseosa mediante una trampa de acetona, tal como un condensador u otra trampa fría. Alternativamente, la acetona se puede eliminar mediante reducción a isopropanol utilizando una transaminasa.

Cuando se elimina el subproducto carbonilo, se puede agregar el donador de grupo amino correspondiente durante la reacción de transaminación para reponer el donador de grupo amino y/o mantener el pH de la reacción. La reposición del donador del grupo amino también desplaza el equilibrio hacia la formación de producto, aumentando de esta manera la conversión de sustrato en producto. Por tanto, en el que el donador del grupo amino es isopropilamina y el producto acetona se elimina in situ, se puede agregar isopropilamina a la solución para reponer el donador de grupos amino perdido durante la eliminación de acetona y para mantener el pH de la reacción (por ejemplo, a aproximadamente 8.5).

Cualquiera de los procesos descritos anteriormente para la conversión de un compuesto de sustrato en un compuesto de producto puede comprender además una o más etapas seleccionadas entre: extracción; aislamiento; purificación; y cristalización del compuesto de producto. Los métodos, técnicas y protocolos para extraer, aislar, purificar y/o cristalizar el producto de amina de mezclas de reacción biocatalítica producidas mediante los métodos divulgados anteriormente son conocidos por el experto con conocimientos básicos y/o se accede a ellos a través de experimentación rutinaria. Adicionalmente, en los siguientes Ejemplos se proporcionan métodos ilustrativos.

Sección J: Ejemplos

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar la invención sin limitar el alcance de la misma, mientras que por otra parte representan realizaciones preferidas de la presente invención.

Abreviaturas:

δ	desplazamiento químico
μl	microlitro
μm	micrómetro
ac.	acuoso
(+)CSA	(+) Ácido alcanforsulfónico
ESTP	Acetato de etilo
IPA	Acetato de isopropilo
TRMA	Trietil amina
Ac	acetilo
AcOH	ácido acético
br	amplio
brm	multiplete amplio
br. m.	multiplete amplio
br. mult.	multiplete amplio
br. s.	señal amplia
br. sign.	señal amplia
cat.	cantidad catalítica
compl. m	multiplete complejo
compl. mult.	multiplete complejo
copl. m.	multiplete complejo
cpl. m.	multiplete complejo
CDCl ₃	cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CH ₂ O	formaldehído
CO ₂	dióxido de carbono
d	doblete
dd	doblete de doblete
de	exceso diastereomérico

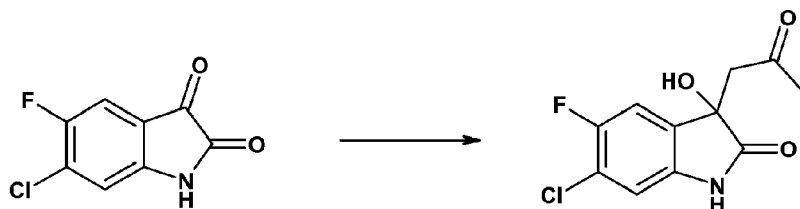
dr	relación diastereomérica
DCM	diclorometano
DEA	dietilamina
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
ee	exceso enantiomérico
equiv	equivalente
ES	electropulverización
ES+	ionización por electropulverización positiva
ESI	ionización por electropulverización
Et	etilo
Et ₂ O	éter de dietilo
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	etanol
FTIR	Transformada de Fourier para infrarrojos
g	gramo(s)
GC	cromatografía de gases
h	hora(s)
HCl	ácido clorhídrico
HCl _(ac.)	solución acuosa de cloruro de hidrógeno
RMN	resonancia magnética nuclear de protones
¹ H RMN	resonancia magnética nuclear de protones
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico
HRMS	espectroscopía de masas de alta resolución
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
Hz	hercios
iPr	isopropilo
iPr ₂ NEt	N-etildiisopropilamina
iProAc	acetato de isopropilo
iPrOH	isopropanol
IR	infrarrojo
J	constante de acoplamiento
K ₂ CO ₃	carbonato de potasio
l	litro
LC-MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas
LCMS	cromatografía líquida-espectrometría de masas
LRMS	espectroscopia de masas de baja resolución
m	multiplete
m/e	relación masa a carga
mg	miligramo
min	minuto(s)
ml	mililitros
mL	mililitros
mmol(es)	milimoles
mol(s)	mole(s)
monosub.	monosustituido
mp	punto de fusión
m.p.	punto de fusión
mult. d	dobletes de multiplete
m/z	relación masa a carga
M	molaridad/molar
Me	metilo
2-MeTHF	2-metiltetrahidrofurano
MeOH	metanol
MgSO ₄	sulfato de magnesio
MS	espectrometría de masas
[MS] ⁺	masa de aducto de protones
MTBE	tercbutilmetiléter
nm	nanómetro
N	átomo de nitrógeno
N ₂	nitrógeno
NaCl	cloruro de sodio
Na ₂ CO ₃	carbonato de sodio
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
NaHMDS	bis(trimetilsilil)amida de sodio

NaOH	hidróxido de sodio
Na ₂ SO ₄	sulfato de sodio
NH ₄ Cl	cloruro de amonio
RMN	resonancia magnética nuclear
oct.	octeto
ppm	partes por millón
psi	libras por pulgada cuadrada
Pd/C	paladio sobre carbono
Pd(PPh) ₃ ₄	tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)
Pt/C	platino sobre carbono
q	cuarteto
Rh/C	rodio sobre carbono
T.AMB. = T.Amb.	temperatura ambiente
s	singulete
sev. brm	varios multipletes amplios
sev. dd	varios dobletes de dobletes
t	triplete
temp.	temperatura
T	temperatura
t _R	tiempo de retención
tBu	butilo terciario
TEA	triethylamina
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
Tol	tolueno
UV	luz ultravioleta
vol.	volumen
wt.	peso

Ejemplo 1: Síntesis de intermedio de cetona

6-Cloro-5-fluoro-3-hidroxi-3-(2-oxo-propil)-1,3-dihidro-indol-2-ona

5



10

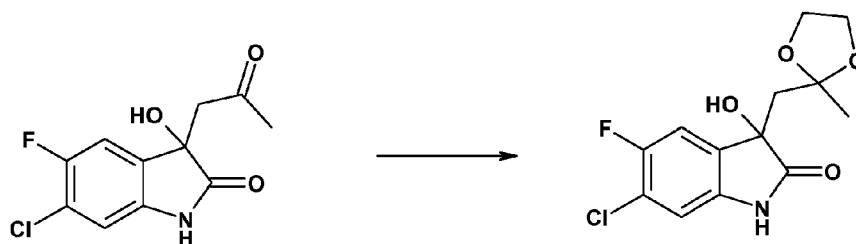
A la suspensión de 6-cloro-5-fluoro-isatina (25 g, 125 mmol) en acetona (620 ml), Et₂NH (0.9 g, 12.5 mmol) y K₂CO₃ (1.7 g, 12.5 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 horas. Después de enfriar hasta T.Amb., se filtró la mezcla de reacción y se eliminó el solvente bajo presión reducida. El producto bruto se volvió a disolver en MeOH (300 ml) a 50 °C y se agregó agua (300 ml). Con la adición de agua, el sólido precipitó. Se eliminó MeOH (250 ml) bajo presión reducida a 50 °C; La mezcla se enfrió a 0-5 °C y se agitó durante 30 minutos; El sólido se filtró y se secó para producir 6-cloro-5-fluoro-3-hidroxi-3-(2-oxo-propil)-1,3-dihidro-indol-2-ona (27 g). ¹H RMN (DMSO-d₆): 2.00(3H, s, CH₃), 3.09(1H, d, CH, J =16Hz), 3.39(1H, d, CH, J =16Hz), 6.16(1H, s, OH); 6.88(1H, d, CH, J =8Hz), 7.36(1H, d, CH, J =12Hz), 10.37(1H, s, NH). MS (ESI) m/z 258.0 (M+H)⁺

15

Método de HPLC: Columna: Agilent Extend-C18; 150 X 3.0 mm; 3.5 µm. Fase Móvil A (H₃PO₄ al 0.1 %) en agua; Fase Móvil B (Acetonitrilo). Gradiente: 0 min (95 % A); 0.5 min (95 % A), 14 min (5 % A), 19.5 min (5 % A). Índice de fluidez: 0.5 ml min⁻¹. Longitud de onda: 210 nm. Temperatura: 40 °C. Tiempo de retención: 7.52 min.

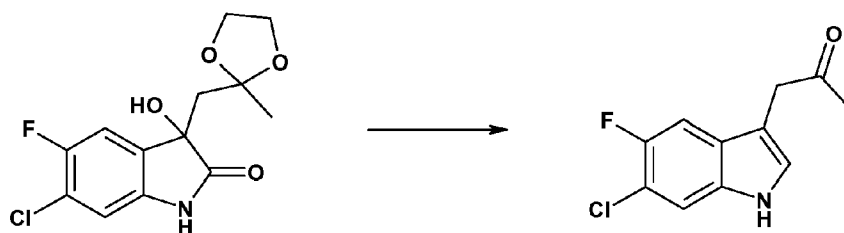
20

6-Cloro-5-fluoro-3-hidroxi-3-(2-metil-[1,3]dioxolan-2-ilmetil)-1,3-dihidro-indol-2-ona



A la suspensión de 6-cloro-5-fluoro-3-hidroxi-3-(2-oxopropil)indolin-2-ona (25 g, 97 mmol) en etilenglicol (250 ml), se agregó ortoformiato de trietilo (43 g, 291 mmol) y monohidrato de ácido tolueno-4-sulfónico (0.9 g, 4.8 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 40-50 °C durante 2 horas. Se agregaron sucesivamente MeTHF (500 ml) y solución acuosa de NaCl al 10 % (500 ml). La capa orgánica se separó y se lavó con agua dos veces. Después de que el solvente se evaporó bajo vacío, el sólido blanco se lavó con TBME (400 ml) y se secó para producir 6-cloro-5-fluoro-3-hidroxi-3-(2-metil-[1,3]dioxolan-2-ilmetil)-1,3-dihidro-indol-2-ona (27.8 g). ¹H RMN (DMSO-d₆): 1.00(3H, s, CH₃), 2.37(2H, d, CH₂), 3.13(1H, q, CHH), 3.58(1H, q, CHH), 3.59(1H, q, CHH), 3.68(1H, q, CHH), 6.00(1H, s, OH); 6.85(1H, d, CH, J = 8Hz), 7.31(1H, d, CH, J = 12Hz), 10.24(1H, s, NH). MS (ESI) m/z 302.0 (M+H)⁺ Método HPLC :Columna: Agilent Extend-C18; 150 X 3.0 mm; 3.5 µm. Fase Móvil A (H₃PO₄ al 0.1 %) en agua; Fase Móvil B (Acetonitrilo). Gradiente: 0 min (95 % A); 0.5 min (95 % A), 14 min (5 % A), 19.5 min (5 % A). Índice de fluidez: 0.5 ml min⁻¹. Longitud de onda: 210 nm. Temperatura: 40 °C. Tiempo de retención: 7.94 min.

1-(6-Cloro-5-fluoro-1H-indol-3-il)-propan-2-ona



A la solución de 6-cloro-5-fluoro-3-hidroxi-3-((2-metil-1,3-dioxolan-2-il)metil)indolin-2-ona (27.8 g, 92 mmol) en THF (250 ml), se agregó lentamente Al Rojo (79.8 g, 276 mmol) en THF (100 ml) a 60 °C bajo atmósfera de N₂. Después de la adición, la mezcla se agitó a T.Amb. durante 3 horas. Se agregó HCl al 20 % (400 ml) y la mezcla se agitó durante 20 minutos. Se agregó acetato de etilo (500 ml) y se agitó durante 10 minutos. La capa orgánica se separó y se lavó con agua (100 ml X 2); después de tratado con Na₂SO₄ (50 g) y carbón activo (5 g) a T.Amb., se filtró la mezcla y se concentró la filtración. El producto bruto se recrystalizó con MeOH (80 ml) y agua (60 ml) para producir 1-(6-cloro-5-fluoro-1H-indol-3-il)-propan-2-ona (15.5 g).

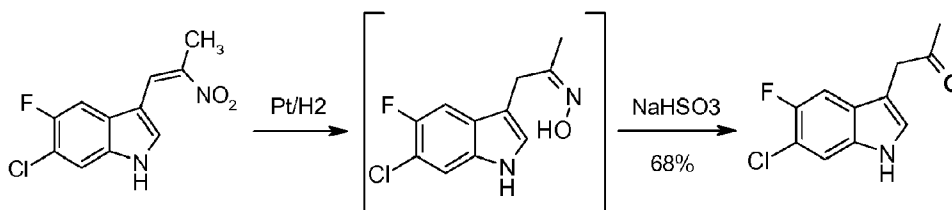
RMN 1H (DMSO-d₆): 2.21(3H, s, CH₃), 3.78(2H, s, CH₂), 7.13(1H, d, CH, J = 4Hz); 7.23(1H, d, CH, J = 8Hz), 7.33(1H, d, CH, J = 8Hz), 8.23(1H, s, NH).

MS (ESI) m/z 226.0 (M+H)⁺

Método HPLC :Columna: Agilent Extend-C18; 150x3.0 mm; 3.5 µm. Fase Móvil A (0.1 % H₃PO₄) en agua; Fase Móvil B (Acetonitrilo). Gradiente: 0 min (95 % A); 0.5 min (95 % A), 14 min (5 % A), 19.5 min (5 % A). Índice de fluidez: 0.5 ml min⁻¹. Longitud de onda: 210 nm. Temperatura: 40 °C Tiempo de retención: 10,75 min.

Ejemplo 2: Segunda síntesis alternativa del material de partida de cetona

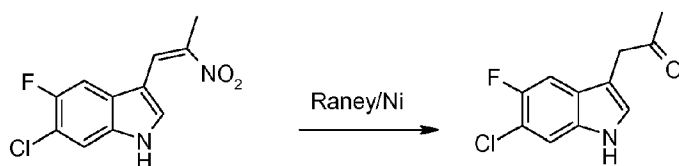
1-(6-Cloro-5-fluoro-1H-indol-3-il)-propan-2-ona



Bajo N₂, Se cargó Pt/C (10 g, 5 % Pt sobre carbono) a la suspensión de 6-cloro-5-fluoro-3-((Z)-2-nitro-propenil)-1H-indol (100 g, 0.39 mol) en acetato de etilo (500 ml). La mezcla de reacción se sometió a vacío y se purgó con H₂ tres veces y se agitó a T.Amb. durante la noche. El catalizador se separó por filtración y el solvente orgánico se eliminó bajo presión reducida para dar un aceite marrón. El aceite se volvió a disolver en EtOH (500 ml) y se agregó bisulfito de sodio (81.7 g, 0.79 mol) en H₂O (). La suspensión se calentó hasta 80 °C durante la noche. El precipitado se separó por filtración y el etanol se eliminó bajo presión. El residuo se diluyó con agua (500 ml) y se extrajo con acetato de etilo (300 ml X 2). La capa orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄ y se condensó en rotavapor para dar un aceite marrón (53 g, 60 % de rendimiento).

Ejemplo 3: Segunda síntesis alternativa de intermedio de cetona

1-(6-Cloro-5-fluoro-1H-indol-3-il)-propan-2-ona



Se cargaron Raney/Ni (0.75 g) y ácido acético (1.1 ml, 19.6 mmol) a la suspensión de 6-cloro-5-fluoro-3-((Z)-2-nitropropenil)-1H-indol (5 g, 19.6 mmol) en la mezcla de MeOH y H₂O (2:1, 50 ml) a T.Amb. La mezcla de reacción se sometió a vacío y se purgó con H₂ tres veces y se calentó a 50 °C durante la noche. Se agregó MeOH (50 ml) a la mezcla de reacción y el catalizador se filtró sobre celita. El solvente se concentró a 50 ml y se agregó H₂O (300 ml). Con la adición de H₂O, se produjo un sólido blancuzco. El sólido se filtró y se lavó con agua. Después de secar en el horno, se aislaron 2.53 g de un sólido blancuzco.

Ejemplo de referencia 4: Síntesis, optimización y cribado de polipéptidos de transaminasas modificados

Síntesis y optimización de genes: La secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido omega transaminasa de tipo silvestre informado de *Vibrio fluvialis* de la SEQ ID NO: 2 se optimizó con codones y se sintetizó como el gen de la SEQ ID NO: 1. El gen sintético de la SEQ ID NO: 1 se clonó en un sistema de vector pCK110900 (véase por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 20060195947, que se incorpora en el presente documento como referencia) y posteriormente se expresó en W3110fhua de *E. coli*. W3110 de *E. coli* expresa los polipéptidos de transaminasas como una proteína intracelular bajo el control del promotor lac. El polinucleótido (SEQ ID NO: 3) que codifica el polipéptido de transaminasa modificado de la SEQ ID NO: 4 se obtuvo mediante evolución dirigida del gen con codones optimizados de la SEQ ID NO: 1. El polipéptido de la SEQ ID NO: 4 tiene diferencias de residuos de 24 aminoácidos (A9T; G18A; D21H; V31M; N45H; F86Y; A133R; R146L; W147K; V153S; K163F; V177L; R211K; P233T; A235P; P244T; M294V; P318D; A323T; S324G; A383V; T391A; C424A; F427Y) con respecto a la SEQ ID NO: 2. Este gen sintético SEQ ID NO: 3 (que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO: 4) se utilizó como estructura principal inicial para una optimización adicional utilizando métodos estándar de evolución dirigida mediante la generación iterativa de bibliotecas de variantes mediante síntesis de genes seguido de cribado y secuenciación de los resultados para generar genes que codifican transaminasas modificadas capaces de convertir el compuesto (IA) al Compuesto (IIA) con propiedades enzimáticas mejoradas en relación con los polipéptidos de la SEQ ID NO: 2 y 4. Las secuencias de polipéptidos de transaminasas modificadas resultantes y las mutaciones específicas y actividades relativas se enumeran en la Tabla 2A.

Ejemplo de referencia 5: Producción de transaminasas modificadas

Los polipéptidos de transaminasas modificados se produjeron en *E. coli* W3110 como una proteína intracelular expresada bajo el control del promotor lac. El polipéptido se acumula principalmente como una enzima activa citosólica soluble. Se utiliza un procedimiento de matraz agitado para generar polvos de polipéptidos modificados que se pueden utilizar en ensayos de actividad o procesos biocatalíticos divulgados en el presente documento.

Crecimiento y expresión de alto rendimiento. Las células se recogieron y se hicieron crecer durante la noche en medio LB que contenía glucosa al 1 % y 30 µg/ml de cloranfenicol (CAM), 30 °C, 200 rpm, 85 % de humedad. Se transfirieron 20 µl de crecimiento durante la noche a una placa de pocillos profundos que contenía 380 µl de medio de crecimiento 2xYT que contenía 30 µg/ml de CAM, IPTG 1 mM, MgSO₄ 1 mM, y se incubaron durante ~18 h a 30 °C, 200 rpm, 85 % de humedad. El medio de subcultivo de TB estaba compuesto por medio de TB (380 µl/pocillo), 30 µg/ml de CAM, MgSO₄ 1 mM e IPTG 1 mM. Los cultivos celulares se centrifugaron a 4000 rpm, 4 °C durante 10 minutos y se desecharon los medios. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 200 o 400 µl de Tampón de Lisis (tampón de trietanolamina (TEA) 0.1 M, pH 9.0, que contenía MgSO₄ 1 mM, 400 µg/ml de PMBS y 500 µg/ml de lisozima), como se describe a continuación.

Producción de polvos para matraces agitados (SFP): Se utilizó un procedimiento de matraz agitado para generar polvos de polipéptidos de transaminasas modificados utilizados en ensayos de cribado secundarios o en el proceso biocatalítico divulgado en el presente documento. El polvo de matraz agitado (SFP) incluye aproximadamente un 30 % de proteína total y, de acuerdo con lo anterior, proporciona una preparación más purificada de una enzima modificada en comparación con el lisado celular utilizado en los ensayos de HTP. Una sola colonia microbiana de *E. coli* que contiene un plásmido que codifica una transaminasa de interés modificada se inocula en 50 ml de caldo Luria Bertani que contiene 30 µg/ml de cloranfenicol y glucosa al 1 %. Las células se hacen crecer durante la noche (al menos 16 horas) en una incubadora a 30 °C con agitación a 250 rpm. El cultivo se diluye en 250 ml de Caldo Terrific (12 g/l de bacto-triptona, 24 g/l de extracto de levadura, 4 ml/l de glicerol, fosfato de potasio 65 mM, pH 7.0, MgSO₄ 1 mM) que contenía 30 µg/ml de cloranfenicol, en un matraz de 1 litro hasta una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0.2 y se dejó crecer a 30 °C. La expresión del gen de la transaminasa se induce mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactósido ("IPTG") a una concentración final de 1 mM cuando la DO₆₀₀ del cultivo es de 0.6 a 0.8 y luego se continúa la incubación durante la noche (al menos 16 horas). Las células se recolectan mediante centrifugación (5000 rpm, 15 min, 4 °C) y se desecha el sobrenadante. El sedimento celular se resuspende con un volumen igual de tampón (cloruro) de trietanolamina 100 mM frío (4 °C), pH 7.0 (que incluye opcionalmente MgSO₄ 2 mM), y se cosechan por

centrifugación como se indicó anteriormente. Las células lavadas se resuspenden en dos volúmenes de tampón de trietanolamina fría (cloruro) y se pasan a través de una prensa francesa dos veces a 12,000 psi mientras se mantienen a 4 °C. Los restos celulares se eliminan mediante centrifugación (9000 rpm, 45 minutos, 4 °C). El sobrenadante del lisado transparente se recogió y se almacenó a -20 °C. La liofilización del lisado transparente congelado proporciona un polvo seco en matraz agitado de polipéptido de transaminasa crudo. Alternativamente, el sedimento celular (antes o después del lavado) se puede almacenar a 4 °C o -80 °C.

Producción de polvos de proceso posterior (DSP): Los polvos de DSP contienen aproximadamente un 80 % de proteína total y, de acuerdo con lo anterior, proporcionan una preparación más purificada de la enzima de transaminasa modificada en comparación con el lisado celular utilizado en el ensayo de alto rendimiento. La fermentación a mayor escala (~100-120 g) de la transaminasa modificada para la producción de polvos de DSP se puede llevar a cabo como un lote corto seguido de un proceso por lotes alimentado de acuerdo con los métodos de bioproceso estándar. Brevemente, la expresión de transaminasas se induce mediante la adición de IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Después de la fermentación, las células se cosechan y se resuspenden en tampón de trietanolamina-H₂SO₄ 100 mM, luego se rompe mecánicamente mediante homogeneización. Los restos celulares y el ácido nucleico se flocculan con polietilénimina (PEI) y la suspensión se clarifica mediante centrifugación. El sobrenadante claro resultante se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de flujo cruzado tangencial para eliminar las sales y el agua. A continuación, el concentrado de enzima concentrado y parcialmente purificado se puede secar en un liofilizador y empacar (por ejemplo, en recipientes de polietileno).

Ejemplo 6: Procedimientos analíticos

Análisis HPLC de reacciones HTP: Una alícuota de la reacción apagada se sometió a análisis por HPLC bajo las siguientes condiciones.

Columna	Mightysil RP-18 GP Aqua 150 x 4.6 mm, 5 μm
Temperatura	30 °C
Fase móvil	Isocrático, NH ₄ Ac 20 mM al 60 % (pH 6.6)/acetonitrilo al 40 %
Índice de fluidez	2.5 ml/min
Detección	254 nm
Tiempos de retención	Compuesto de producto de amina (IIA): 0.96 min; Impureza del sustrato: 1.8 minutos; Compuesto de sustrato de cetona (IA): 2.7 min

Conversión del compuesto (IA) al compuesto (IIA) Se determinó a partir de los cromatogramas resultantes de la siguiente manera:

$$\text{Conversión (\%)} = \frac{\text{Área de Producto}}{(\text{Área de Producto} + \text{Área de Sustrato} \times 0.73)} \times 100\%$$

Análisis por HPLC de reacciones a escala de 5 ml y 100 ml: Se sometieron alícuotas de la reacción apagada a análisis por HPLC bajo las siguientes condiciones.

Columna	Mightysil RP-18 GP Aqua 250 x 4.6 mm, 5 μm
Temperatura	30 °C
Fase móvil	Isocrático: NH ₄ Ac 20 mM al 60 % (pH 6.6)/acetonitrilo al 40 %
Índice de fluidez	2.0 ml/min
Detección	254 nm
Tiempos de retención	Compuesto de producto de amina (IIA): 2.1 min Compuesto de sustrato de cetona (IA): 7.6 min

La conversión del compuesto (IA) al compuesto (IIA) se determinó a partir de los cromatogramas de la siguiente manera:

$$\text{Conversión (\%)} = \frac{\text{Área de Producto}}{(\text{Área de Producto} + \text{Área de Sustrato} \times 0.73)} \times 100\%$$

Determinación de la pureza quiral del producto (% de ee): La pureza quiral o exceso enantiomérico del compuesto (IIA) se evaluó mediante HPLC utilizando las siguientes condiciones.

Columna	Columna Astec Chirobiotic TAG
Temperatura	15 °C
Fase móvil	Metanol/ácido acético/trietilamina (100/0.2/0.1)
Índice de fluidez	1.0 ml/min
Longitud de onda de detección	225 nm
Tiempos de retención	Sustrato de cetona: 3.6 min Producto R: 17.9 min;

	Producto S: 18.9 min
--	----------------------

Determinación de la pureza del producto: La pureza del producto se determinó mediante HPLC utilizando las siguientes condiciones.

Columna	Mightysil Rp-18 GP agua 250 X 4.6 mm, 5 µm	
Temperatura	30 °C	
Fase móvil	Gradiente. A: NH ₄ Ac 20 mM (pH 6.6); B: acetonitrilo	
	Tiempo	Composición
	0 min	5 % de B
	1.5 min	5 % de B
	35 min	70 % de B
	40 min	70 % de B
	45 min	5 % de B
	60 min	5 % de B
Índice de fluidez	1.5 ml/min	
Longitud de onda de detección	254 nm	
Tiempos de retención	Impureza principal: 22.2 min; producto de amina: 17.5 min; sustrato de cetona: 25.4 min	

5

Ejemplo 7: Cribado de alto rendimiento (HTP) de transaminasas para la conversión del compuesto (IA) al compuesto (IIA)

10 Ensayos de cribado de HTP: El cribado de alto rendimiento utilizado para guiar la selección primaria de variantes se llevó a cabo en placas de 96 pocillos utilizando lisados celulares bajo condiciones de ensayo de 10 g/l de compuesto (IA); fosfato de piridoxal (PLP) 1 mM; isopropilamina (IPM) 2 M, pH 7.0; trietanolamina (TEA) 0.1 M, pH 7; 5 % v/v de PEG200; 10 µl de lisado; y 50 o 55 °C.

15 Las células se hacen crecer en placas de 96 pocillos como se describió anteriormente y los lisados se prepararon al dispensar 200 µl (para la Ronda 1) o 400 µl (para la Ronda 2) de Tampón de Lisis (1 mg/ml de lisozima, 0.5 mg/ml de sulfato de polimixina B, PLP 1 mM, trietanolamina (TEA) 0.1 M, pH 7.0) en cada pocillo. Las placas se sellaron, se agitaron durante 2 h y luego se centrifugaron durante 20 min a 4000 rpm a 4 °C para sedimentar los restos celulares.

20 Se agregaron 10 µl de solución madre de sustrato (200 g/l del compuesto (IIA) disuelto en PEG200) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos, seguida de 180 µl de una solución madre de isopropilamina (IPM)/fosfato de piridoxal (PLP) (IPM 2.2 M y PLP 1.06 mM en TEA 100 mM, pH 7.0. Para evaluar la refractariedad a la inhibición del compuesto de producto (IIA), se agregó el compuesto (IIA) a la mezcla de reacción hasta una cantidad final de 14 g/l para los ensayos de la Ronda 1 y 16 g/l de la Ronda 2. Las reacciones se iniciaron al agregar 10 µl de lisado celular/pocillo. Las placas se sellaron y se incubaron con agitación a 50 o 55 °C durante 24 h. Las reacciones se apagaron con 600 µl de acetonitrilo y las muestras se examinaron mediante HPLC como se describe en el Ejemplo 5.

25

Ejemplo 8: Proceso de conversión del compuesto (IA) al compuesto (IIA) en escala de 5 ml

30 Las reacciones a escala de 5 ml se llevaron a cabo de la siguiente manera. A un vial de vidrio de 20 ml equipado con una barra agitadora magnética en forma de cruz se agregó 0.75 ml (o 0.5 ml en el caso de una concentración de 10 % v/v de PEG 200) de tampón de TEA 100 mM (pH 7.0). Se agregaron al vial 2 ml de solución madre de IPM·HCl 5 M seguidos de 1 ml de solución madre de PLP 5 mM. La mezcla se agitó a 500 rpm (agitación magnética). Luego se ajustó el pH de la mezcla a 7.0 utilizando una solución de NaOH 1 M. Luego se agregaron al vial 125 mg (o 250 mg para una concentración de 50 g/l o 500 mg para una concentración de 100 g/l) de sustrato (sólido). Luego se agregaron a la mezcla 0.25 ml (o 0.5 ml para 10 % v/v) de PEG 200. Las concentraciones finales de los componentes fueron: 25 g/l (o 50 ó 100 g/l) de compuesto (IA); PLP 1 mM; IPM 2 mM; 5 % v/v (o 10 %) de PEG 200; 2 g/l de enzima TA; TEA 100 mM, pH 7.0). Luego la mezcla se agitó y se calentó a 50 °C.

35

40 Las reacciones se iniciaron al agregar 1 ml de la solución madre de enzima (10 g/l). Se tomaron muestras de 20 µl en diferentes puntos de tiempo y se diluyeron con 750 µl de metanol y se analizaron mediante HPLC. Después de 24 h, las mezclas de reacción se apagaron con 5 ml de acetonitrilo y las muestras se analizaron mediante HPLC para conseguir el % de conversión final.

40

Ejemplo 9: Proceso de conversión del compuesto (IA) al compuesto (IIA) en escala de 100 ml

45

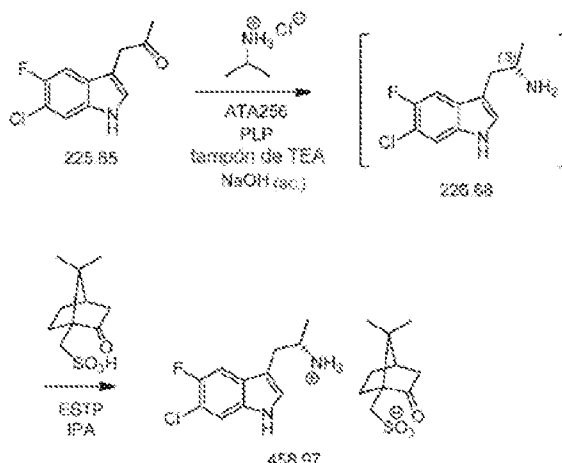
Se llevó a cabo una reacción a escala de 100 ml como sigue. A un matraz de fondo redondo de 250 ml con una paleta agitadora en forma de ancla se le agregaron 15 ml de tampón TEA 100 mM (pH 7). Se agregaron 40 ml de la solución madre de IPM·HCl 5 M al matraz de fondo redondo seguido de 20 ml de la solución madre de PLP 5 mM. La mezcla se agitó a 100 rpm (agitación superior) y el pH se ajustó a 7.0 utilizando NaOH 10 M. Luego se agregó el Compuesto de sustrato sólido (IA) al matraz de fondo redondo durante ~5 minutos con agitación. Luego se agregó PEG 200 (5 ml)

50

y la mezcla se calentó a 50 °C. Luego se agregaron 20 ml de la solución madre de enzima (10 g/l) para iniciar la reacción. La reacción se agitó a 200 rpm (agitación superior). Se tomaron muestras de 20 µl en diferentes puntos de tiempo y se diluyeron con 750 µl de metanol y se analizaron mediante HPLC. En algunos casos, cuando no se prosiguió con el tratamiento final, después de 24 h, las mezclas de reacción se apagaron con 100 ml de acetonitrilo y las muestras se analizaron mediante HPLC para obtener el % de conversión final (Figura 9). Concentración de diferentes componentes en la reacción: cetona: 25 g/l (o 50 o 100 g/l); PPL: 1 mm; IPM: 2 mM; PEG200: 5 % v/v; Enzima TA: 2 g/l; tampón: TEA 100 mM, pH 7.0. La conversión del sustrato en producto se analizó mediante HPLC como se describe en el Ejemplo 3.

Tratamiento final del producto: Después de 24 h de reacción bajo las condiciones descritas anteriormente (hasta el punto 11), la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado estándar G4 con un trozo de papel de filtro (Whatman 1, tamaño de poro 11 µm). El matraz de fondo redondo se enjuagó con 20 ml de agua desionizada que luego se filtró a través del mismo embudo. La torta de filtración se lavó dos veces con 20 ml de agua desionizada. El pH del filtrado se ajustó de 6.8 a 3 utilizando una solución de HCl 5 M. Luego se transfirió el filtrado a un embudo de decantación y se extrajo con 100 ml de MTBE. Se dejó separar la mezcla bifásica. Se descartó la capa de MTBE que contenía sustrato sin reaccionar e impurezas. La capa acuosa se transfirió a un vaso de precipitados y se agregaron 100 ml de MTBE. Luego se ajustó el pH de la capa acuosa desde 3 hasta 10 utilizando una solución de NaOH 10 M. La mezcla se transfirió a un embudo de decantación y se dejó que las fases se separaran. Luego se extrajo la capa acuosa con 100 ml de MTBE tres veces (nb: se repitió hasta que el producto no estuvo presente en la capa acuosa). Las fases de MTBE de las tres extracciones se combinaron y se evaporaron hasta secado utilizando un evaporador rotativo. El producto bruto se secó adicionalmente al vacío durante 48 h.

Ejemplo 10: Proceso de conversión del compuesto (IA) al compuesto (IIA) en escala de 30 g



Se disolvieron 152.48 g de clorhidrato de isopropilamina y 0.204 g de monohidrato de piridoxalfosfato en 495 ml de agua mientras se agitaba. A esta solución transparente de color amarillo se le agregó una solución de 30.0 g de cetona en 85 ml de polietilenglicol (peso molar promedio 200) en 15 minutos. Tras la adición, la cetona precipita en forma de partículas finas que se distribuyen uniformemente en el medio de reacción. A la suspensión se le agregaron 180 ml de tampón de trietanolamina (0.1 mol/l, pH 7) y el pH se ajustó a 7 mediante adición de una solución acuosa de hidróxido de sodio (1 mol/l). La mezcla de reacción se calienta a 50 °C y se agrega una solución de 1.62 g de transaminasa de la SEQ ID NO: 134 disuelta en 162 ml de tampón de trietanolamina (0.1 mol/l, pH 7). La mezcla de reacción se mantiene continuamente a pH 7 mediante la adición de una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 mol/l. La mezcla de reacción se agita durante 24 horas a 50 °C y se sopla una corriente de Nitrógeno sobre la superficie de la mezcla de reacción para quitar la acetona formada. Luego se enfría la mezcla de reacción a 25 °C y se filtra sobre un lecho de flocado de celulosa. El pH del filtrado se ajusta a ≈1 mediante la adición de ácido sulfúrico concentrado. El filtrado acidificado se extrae con 250 ml de acetato de isopropilo. Las capas se separan y el pH de la fase acuosa se ajusta a ≈10 mediante la adición de solución acuosa concentrada de hidróxido de sodio. La fase acuosa basicificada se extrae con acetato de isopropilo. Se separan las capas y se lava la fase orgánica con 100 ml de agua. La fase orgánica se concentra por destilación hasta 2/3 de su volumen original. En un segundo reactor se disuelven 33.98 g de ácido (+)-alcanforsulfónico en 225 ml de acetato de isopropilo a reflujo y se agrega la fase orgánica concentrada en 10 minutos. Después de completar la adición, la suspensión fina formada se enfría a 0 °C en 2 horas y se mantiene a 0 °C durante 15 horas. La sal de sulfonato de amina-(+)-alcanfor precipitada se filtra, se lava con 70 ml de acetato de isopropilo y se seca a 40 °C al vacío, produciendo 51.57 g de cristales incoloros (rendimiento t.q. del 84.5 %).

Datos analíticos

IR:

$\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3296, 3061, 2962, 2635, 2531, 2078, 1741, 1625, 1577, 1518, 1461, 1415, 1392, 1375, 1324, 1302, 1280, 1256, 1226, 1170, 1126, 1096, 1041, 988, 966, 937, 868, 834, 814, 790, 766, 746, 719, 669, 615.

5 LC-MS (ESI +):

Ion de amonio: m/z = 227 ([M+H]), 268 ([M+H+CH₃CN]), 453 ([2M+H]).

Ion de canforsulfonato: m/z = 250 ([M+NH₄]), 482 ([2M+NH₄]).

10

LC-MS (ESI -):

Ion de canforsulfonato: m/z = 231 ([M-H]), 463 ([2M-H]).

15 ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz):

11.22 (br. s., 1H), 7.75 (br. s., 3H), 7.59 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 3.37 - 3.50 (m, 1H), 2.98 (dd, J = 14.3, 5.8 Hz, 1H), 2.91 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 2.81 (dd, J = 14.3, 8.0 Hz, 1H), 2.63 - 2.74 (m, 1H), 2.41 (d, J = 14.6 Hz, 1H), 2.24 (dt, J = 18.3, 3.8 Hz, 1H), 1.94 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 1.86 (dt, J = 7.4, 3.6 Hz, 1H), 1.80 (d, J = 18.1 Hz, 1H), 1.23 - 1.35 (m, 2H), 1.15 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.05 (s, 3H), 0.74 (s, 3H)

20

Amina libre (obtenida al evaporar la capa de iso-propilacetato después de la extracción de la capa acuosa basificada):

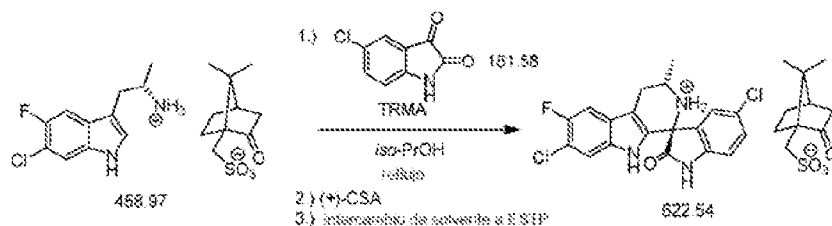
¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆):

25

11.04 (br. s., 1H), 7.50 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 3.03 (sxt, J = 6.3 Hz, 1H), 2.61 (dd, J = 14.3, 6.5 Hz, 1H), 2.57 (dd, J = 14.1, 6.5 Hz, 1H), 1.36 (br. s., 2H), 0.96 (d, J = 6.3 Hz, 3H)

Ejemplo de referencia 11: Proceso para la conversión del compuesto (IIA) al compuesto (IVB)

30



Se suspenden 13.62 g de 5-cloroisatina en 35 ml de iso-propanol y se agregan 2.3 g de trietilamina. La suspensión se calienta a reflujo y se disuelve una solución de 34.42 g de sal de sulfonato de amina-(+)-alcanfor en 300 ml de iso-propanol en 50 minutos. La mezcla de reacción se agita a reflujo durante 17 horas. La mezcla de reacción se enfría a 75 °C y se agregan a la mezcla de reacción 17.4 g de ácido (+)-alcanforsulfónico. Aproximadamente 300 ml de iso-propanol se elimina mediante destilación al vacío. El iso-propanol destilado se reemplaza por acetato de iso-propilo y se continúa con destilación al vacío. Esta destilación se repite una segunda vez. Al residuo de destilación se le agregan 19 ml de etanol y 265 ml de acetato de etilo y la mezcla se calienta a reflujo. La mezcla se enfría en rampas hasta 0 °C y se mantiene a 0 °C durante 24 horas. Los cristales de color beige a blancuzco se filtran, se lavan con 3 porciones (cada una de 25 ml) de acetato de etilo preenfriado (0 °C) y se secan al vacío, produciéndose 40.3 g de cristales de color beige a blancuzco (86.3 % de rendimiento t.q.)

35

40

IR:

45

$\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3229, 3115, 3078, 3052, 2971, 2890, 2841, 2772, 2722, 2675, 2605, 2434, 1741, 1718, 1621, 1606, 1483, 1460, 1408, 1391, 1372, 1336, 1307, 1277, 1267, 1238, 1202, 1184, 1162, 1149, 1128, 1067, 1036, 987, 973, 939, 919, 896, 871, 857, 843, 785, 771, 756, 717, 690, 678, 613.

50 LC-MS (ESI +):

Ion de amonio: m/z = 390 ([M+H]), 431 ([M+H+CH₃CN])

Ion de canforsulfonato: m/z = 250 ([M+NH₄]), 482 ([2M+NH₄])

55

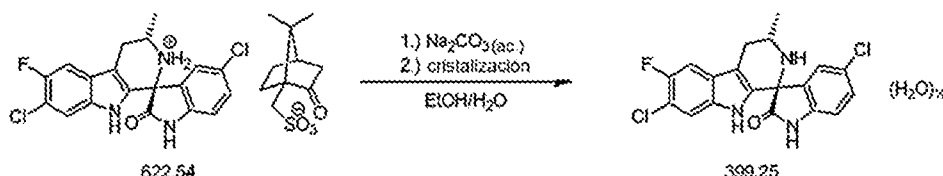
LC-MS (ESI-):

Ion de canforsulfonato: m/z = 231 ([M-H]), 463 ([2M-H])

¹H RMN (DMSO-d₆, 600 MHz):

11.49 (s, 1H), 11.23 (s, 1H), 10.29 - 10.83 (m, 1H), 9.78 - 10.31 (m, 1H), 7.55 - 7.60 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.40 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.52 - 4.63 (m, 1H), 3.20 (dd, J = 16.3, 4.2 Hz, 1H), 2.96 (dd, J = 16.1, 11.3 Hz, 1H), 2.90 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 2.56 - 2.63 (m, 1H), 2.39 (d, J = 14.6 Hz, 1H), 2.21 (dt, J = 18.0, 3.8 Hz, 1H), 1.89 - 1.93 (m, 1H), 1.81 (ddd, J = 15.3, 7.8, 3.7 Hz, 1H), 1.76 (d, J = 18.3 Hz, 1H), 1.53 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.20 - 1.33 (m, 2H), 0.98 (s, 3H), 0.70 (s, 3H)

Ejemplo de referencia 12: Proceso para preparar un compuesto de fórmula (IVA) ½ Hidrato



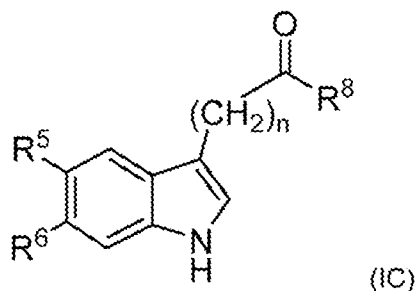
En un reactor de 750 ml con agitador de impulsor, se disolvieron 50 g de sal del compuesto (IVB) en 300 ml de etanol (ALABD) y 100 ml de agua desionizada (WEM). La solución clara y amarillenta se calentó a una temperatura interna de 58 °C. A la solución se le agregaron 85 g de una solución acuosa al 10 % de carbonato de sodio en 10 minutos. La solución transparente se filtró en partículas a un segundo recipiente de reacción. El recipiente y el filtro de partículas se enjuagaron cada uno con 25 ml de una mezcla de etanol:agua (3:1 v/v) en el segundo recipiente de reacción. La solución filtrada de partículas combinadas se calienta a una temperatura interna de 58 °C y se agregan gota a gota 200 ml de agua (WEM) en 15 minutos. Hacia el final de la adición la solución se vuelve turbia. La mezcla se agita durante 10 minutos a una temperatura interna de 58 °C y después se enfría lentamente hasta temperatura ambiente en 4 horas y 30 minutos formando una suspensión blanca espesa y bien agitable. A la suspensión se le agregan 200 ml de agua y la mezcla se agita durante 15 horas y 20 minutos adicionales a temperatura ambiente. La suspensión se filtra y la torta de filtración se lava dos veces con porciones de 25 ml de una mezcla de etanol:agua 9:1 (v/v). Los cristales incoloros se secan a 60 °C al vacío produciendo 26.23 g (=91.2 % de rendimiento).

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆)

10.70 (s, 1H), 10.52 (s, 1H), 7.44 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 7.33 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.05 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.83 - 4.00 (m, 1H), 3.13 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 2.77 (dd, J = 15.1, 3.8 Hz, 1H), 2.38 (dd, J = 15.1, 10.5 Hz, 1H), 1.17 (d, J = 6.3 Hz, 3H).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (IC):



en el que:

R⁵ y R⁶ son cada uno, independientemente, halo, hidroxilo, alquilo (C₁-C₆), trihalo alquilo (C₁), ciano o alcoxi (C₁-C₆);

R⁸ es alquilo (C₁-C₆), opcionalmente sustituido con un hidroxilo;

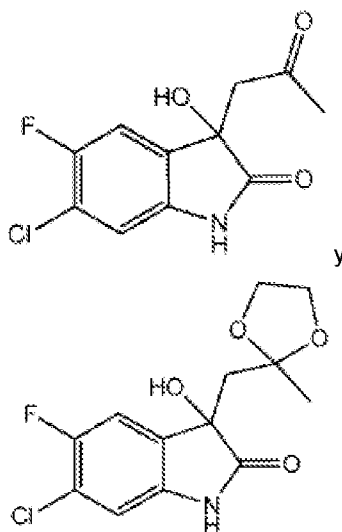
n es 1 o 2;

o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R⁵ y R⁶ son fluoro cuando R⁸ es -CH₃, y n es 1.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R⁵ y R⁶ son fluoro y cloro, cuando R⁸ es -CH₃, y n es 1.

4. Un compuesto seleccionado de:



o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.