



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 286 262**

⑯ Int. Cl.:

**C12N 15/55** (2006.01)

**C12N 9/80** (2006.01)

**C12P 41/00** (2006.01)

**C12P 13/04** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **02747739 .7**

⑯ Fecha de presentación : **15.07.2002**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1409688**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

⑯ Título: **Secuencias de ácido nucleico que codifican para amidasas enantio-selectivas.**

⑯ Prioridad: **23.07.2001 EP 01202822**  
**23.07.2001 EP 01202821**

⑯ Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**  
**Het Overloon 1**  
**6411 TE Heerlen, NL**

⑯ Fecha de publicación de la mención BOP: **01.12.2007**

⑯ Inventor/es: **Sonke, Theodorus;**  
**Tandler, Renate, Francisca;**  
**Korevaar, Cornelis, Gerrit, Nijs;**  
**Assema van, Friso, Bernard, Jan y**  
**Pol van der, Rudolf**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente: **01.12.2007**

⑯ Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

**ES 2 286 262 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

Secuencias de ácido nucleico que codifican para amidas enantio-selectivas.

5 La invención describe secuencias de ácido nucleico que codifican para amidas enantio-selectivas. La invención también se refiere a los vectores, y las células hospederas que comprenden las secuencias de ácido nucleico de acuerdo a la invención así como el proceso para producir y usar los productos de expresión de las secuencias de ácido nucleico.

10 Las amidas son polipéptidos con actividad amidasa y son enzimas con la capacidad de catalizar la hidrólisis de las amidas de ácido carboxílico para formar los ácidos carboxílicos correspondientes y amoníaco. Las amidas son amidas enantio-selectivas con una preferencia por uno de los enantiómeros de una amida de ácido carboxílico como un sustrato. Se conoce que las amidas enantio-selectivas son valiosas en los bio-procesos comerciales en la producción de ácidos carboxílicos enantioméricamente enriquecidos. Los ácidos carboxílicos son por ejemplo los ácidos  $\alpha$ -H- $\alpha$ -amino, ácidos  $\alpha,\alpha$ -dialquilamino, ácidos  $\alpha$ -hidroxi y/o derivados de los mismos así como péptidos de los mismos.

15 15 Los ácidos carboxílicos enantioméricamente enriquecidos y/o los derivados de los mismos así como los péptidos son usados en varias industrias, como por ejemplo la industria farmacéutica, la industria agroquímica etc. Por ejemplo, el amino ácido L-valina es altamente apropiado como un precursor en las fermentaciones de la ciclosporina A, el ácido hidroxipropiónico es usado en la producción de herbicidas, algunos ácidos  $\alpha$ -N-hidroxiamino pueden ser usados como agentes anti-tumorales y la D-*p*-hidroxifenilglicina y la D-fenilglicina son usadas en la producción de ciertos 20 antibióticos de  $\beta$ -lactama semi-sintéticos de amplio espectro. En EP 494 716 81 dos ejemplos de microorganismos que exhiben actividad amidasa son dados: el *Ochrobactrum anthropi* NCIB 40321 (también conocido como NCIMB 40321) y la *Klebsiella sp.* NCIB 40322.

25 W.J.J. van den Tweel y otros describieron el *Ochrobactrum anthropi* NCIB 40321 como un biocatalizador con actividad amidasa L-específica de amplio espectro. El *Ochrobactrum anthropi* NCIB 40321 fue seleccionado por su capacidad de hidrolizar amidas racémicas L-selectivamente. La especificidad del sustrato de todas las células *O. anthropi* es remarcadamente amplio y oscilan desde las amidas del ácido alfa-H-alfa-amino, alfa-alquil-alfa-amino, N-hidroxi-alfa-amino a las amidas del ácido alfa-hidroxi (Appl Microbiol. Biotechnol. 39, 296-300, 1993).

30 30 Komeda H. y otros describieron el gen que codifica para la D-amino ácido amidasa estereospecífica a partir del *Ochrobactrum anthropi* SV3 el cual fue clonado y secuenciado. El análisis de 7.3 kb de ADN genómico reveló la presencia de seis ORFs, uno de los cuales (daaA) codifica la D-amino-ácido amidasa. Esta enzima, DaaA, está compuesta de 363 residuos de amino ácidos (masa molecular 40 082 Da), y la secuencia de amino ácido deducida exhibe homología con la D-peptidasa alcalina del *Bacillus cereus* DF4-B (32% de identidad) (Biochemistry 267, 2028-2035, 2000).

35 J-F. Mayaux y otros describieron una amidasa enantiómero-selectiva activa en varias 2-aryl y 2-ari洛xi propionamidas de la cepa R312 de *Brevibacterium sp.* de la cual la enzima fue purificada y clonada (J. Bacteriology 172, 6764-6773, 1990).

40 40 B. Kaptein y otros, describieron una síntesis en gran escala de cuatro alfa-amino ácidos, C-alfa-tetrasustituidos enantiopuros, estéricamente restringidos, todos caracterizados por una cadena lateral CgammaCdelta de doble enlace. Usando uno de ellos (L-Mag), una bencil amida tetrapéptida Nalfa-protectida fue preparada (Tetrahedron 57, 6567-6577, 2001).

45 50 US4080259 describió las preparaciones enzimáticas con actividad (L-alfa)-Aminoacil amidasa obtenidas cultivando *Pseudomonas putida*, *Ps. reptilivora* o *Ps. arvilla* en un medio contenido fuentes de O, N y P asimilables. Preferiblemente fue usado *Ps. putida* ATCC 12633 o un mutante. La actividad (L-alfa)-Aminoacil amidasa es especialmente usada para la preparación de L-fenilglicina y D-fenilglicinamida a partir de DL-fenilglicina y D-fenilglicinamida a partir de DL-fenilglicinamida. Además US4080259 enseñó que la enzima puede ser activada de una manera bien conocida, por ejemplo mediante la adición de un compuesto metálico tal como un compuesto de magnesio, manganeso, o zinc (col.2, líneas 48-50).

55 60 W09961633 describió un método de fermentación que comprende: (a) cultivar un transformante bacteriano en un bio-reactor que contiene un medio discontinuo libre de antibióticos que comprende una fuente de carbono, una mezcla de sal inorgánica, y una fuente de nitrógeno, bajo condiciones de cultivo discontinuas; (b) alimentar bajo condiciones de retroalimentación el cultivo de (a), en el punto final de la fase discontinua, después de la elevación de la DO (concentración del oxígeno disuelto) por encima de un punto de umbral establecido, una porción del medio de retroalimentación, comprendiendo una fuente de carbono, y una sal de magnesio; y (c) permitir al transformante bacteriano metabolizar el medio de alimentación. Además, W09961633 enseñó, que una solución de elementos de traza es adicionada en el paso (a) y/o (b), y donde la solución de los elementos de traza comprende iones  $Zn^{+2}$  ( $ZnSO_4 \times 7 H_2O$  13.8 mg/l).

65 La invención especialmente describe secuencias de ácido nucleico que codifican para las amidas enantio-selectivas con una secuencia de amino ácido, la cual tiene al menos 70% de identidad con la SEQ ID: NO 2. En la SEQ ID: NO. 1 la secuencia de ácido nucleico que codifica para la L-amidasa del *Ochrobactrum anthropi* NCIB 40321 es presentada. En la SEQ ID: NO. 2, la secuencia de amino ácido correspondiente a la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID: NO. 1 es presentada. Ha sido sorprendentemente encontrado que una fermentación, que comprende una

## ES 2 286 262 T3

fase discontinua y una fase de alimentación, de un microorganismo que expresa un ácido nucleico que codifica para una amidasa enantio-selectiva con una secuencia de amino ácido, la cual tiene al menos 70% de identidad con la SEQ ID: NO. 2 en un medio de fermentación resulta en una producción incrementada de la actividad de la amidasa enantio-selectiva si en la fase de alimentación entre 0.5 y 50 mg/l del Zn<sup>+2</sup> del medio de fermentación es alimentado al medio de fermentación.

5 Esta producción incrementada de la actividad de la amidasa enantio-selectiva es probablemente debida a un incremento en la actividad de la amidasa enantio-selectiva en sí misma así como a un incremento en la cantidad de la amidasa enantio-selectiva producida. En EP 1,174,499 Al una secuencia de ácido nucleico que codifica para una amidasa enantio-selectiva del *Enterobacter cloacae* N-7901 ha sido descrita; la secuencia de amino ácido correspondiente tiene 68% de identidad con la secuencia de amino ácido correspondiente a la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. Las secuencias de ácido nucleico que codifican para las amidasas enantio-selectivas de acuerdo a la invención son por lo tanto nuevas. La dependencia al Zn<sup>+2</sup> de la fermentación de los microorganismos que expresan la secuencia de ácido nucleico que codifica para una amidasa enantio-selectiva del *Enterobacter cloacae* N-7901 no ha sido descrita en EP 1,174,499.

10 La presente invención preferiblemente describe secuencias de ácido nucleico que codifican para las amidasas enantio-selectivas con secuencias de amino ácidos, que tienen un grado de identidad con la SEQ ID NO. 2 de al menos alrededor de 75%, más preferiblemente al menos alrededor de 80%, aún más preferiblemente al menos alrededor de 20 85%, lo más preferiblemente al menos alrededor de 90%, más preferiblemente al menos 95% y todavía aún más preferiblemente al menos 97%, en particular al menos 98%, más en particular al menos 99%, lo más en particular 100%.

25 Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de amino ácidos es determinado por el algoritmo de alineación BLASTP (NCBI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación: Mismatch = -15, Penalty -3, Gap-Extend = 1, Match-Bonus = 1, Gap x-droff= 50, Expect=10, Word Size =3.

30 La presente invención también describe secuencias de ácido nucleico que codifican para amidasas enantio-selectivas, cuyas secuencias de ácido nucleico preferiblemente hibridizan bajo un medio, más preferiblemente bajo condiciones de alta astringencia y más preferiblemente, condiciones de astringencia muy altas con (i) SEQ ID NO. 1, (ii) una secuencia de ADN genómica que comprende la SEQ ID NO. 1 o (iii) una hebra complementaria de (i) o (ii).

35 Los experimentos de hibridización pueden ser llevados a cabo por una variedad de métodos, los que están disponibles para la persona versada en el arte. Guías generales para seleccionar entre esos varios métodos pueden ser encontradas en por ejemplo el capítulo 9 de Sambrook, J, Fritsh, E. E., y Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2da ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY. 1989.

40 Por astringencia de las condiciones de hibridización se entiende, las condiciones bajo las cuales son realizadas la hibridización, consistente en la hibridización actual y los pasos de lavado. Los pasos de lavado son usados para lavar los ácidos nucleicos, los cuales no hibridizan con el ácido nucleico diana inmovilizado en por ejemplo un filtro de nitrocelulosa. La astringencia de las condiciones de hibridización pueden por ejemplo ser modificadas cambiando la concentración de sal de la solución de lavado y/o cambiando la temperatura bajo la cual el paso de lavado es realizado (temperatura de lavado). La astringencia de la hibridización aumenta disminuyendo la concentración de sal en la solución de lavado o elevando la temperatura de lavado. Para los propósitos de esta solicitud, la hibridización es llevada a cabo en 6 X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45°C durante alrededor de 12 horas. Dos pasos de lavado consecutivos de 30 minutos en 1 X SSC, 0.1% SDS a 50°C es un ejemplo de baja astringencia, a 55°C un ejemplo de astringencia media, a 60°C un ejemplo de alta astringencia, a 65°C un ejemplo de muy alta astringencia.

50 La invención también describe secuencias de ácido nucleico que codifican para las amidasas enantio-selectivas con una secuencia de amino ácido de acuerdo a la SEQ ID: NO. 2 con alteraciones en alrededor de 15 o menos posiciones de amino ácido, preferiblemente en alrededor de 10 o menos posiciones de amino ácido, más preferiblemente en alrededor de 5 o menos, aún más preferiblemente en alrededor de 3 o menos posiciones de amino ácido, donde la(s) alteración(nes) son/es independientemente (i) una inserción de un amino ácido (ii) una eliminación de un amino ácido (iii) una sustitución de un amino ácido.

60 Las secuencias de ácido nucleico que codifican para las amidasas enantio-selectivas con una secuencia de amino ácido dada en la SEQ ID: NO. 2 con un número de alteraciones, pueden ser preparadas de una manera conocida en el arte, por ejemplo con mutagénesis dirigida en un sitio de la secuencia de ácido nucleico. En este método un oligonucleótido mutagénico que codifica la(s) mutación(nes) deseada(s), tal como una sustitución, inserción o eliminación en una posición de amino ácido específica, es recocido a una hebra del ADN de interés y sirve como un cebador para la iniciación de la síntesis de ADN. Para la síntesis de ADN un oligonucleótido mutagénico es incorporado en la hebra nuevamente sintetizada. A menudo, los métodos conocidos en el arte también tienen una técnica de selección positiva para las secuencias de ácido nucleico mutagénico para mejorar la eficiencia del método de mutagénesis dirigida a un sitio. Algunas técnicas de mutagénesis dirigida a un sitio hacen uso de la PCR, en la cual un oligonucleótido mutagénico es usado como un cebador. Los métodos para lograr mutaciones dirigidas a un sitio son descritos en varios folletos de productos de compañías, como por ejemplo Stratagene e Invitrogen y kits para lograr mutaciones dirigidas a un sitio están comercialmente disponibles.

La presente invención también describe secuencias de ácido nucleico que codifican para las amidasas enantio-selectivas, las cuales exhiben reactividad inmunológica cruzada con un anticuerpo elevado contra un fragmento de la secuencia de amino ácido de acuerdo a la SEQ ID: NO. 2. La longitud de cada fragmento es preferiblemente al menos de 20 amino ácidos. La reactividad inmunológica cruzada puede ser ensayada usando un anticuerpo elevado contra, 5 o reactivo con, al menos un epítopo del polipéptido aislado de acuerdo a la presente invención teniendo actividad amidasa. El anticuerpo, el cual puede ser monoclonal o policlonal, puede ser producido por métodos conocidos en el arte, por ejemplo como es descrito por Hudson y otros, Inmunología Práctica, Tercera Edición (1989), Blackwell Scientific Publications. La reactividad inmunoquímica cruzada puede ser determinada usando ensayos conocidos en el 10 arte, un ejemplo del cual es la técnica de Western blot, por ejemplo como es descrito en Hudson y otros, Inmunología Práctica, Tercera Edición (1989), Blackwell Scientific Publications.

La presente invención también describe secuencias de ácido nucleico que codifican para las proteínas de fusión de la amidasa enantio-selectiva, las cuales consisten de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo a la invención operativamente unido a una o más secuencias de ácido nucleico, que codifica (un) polipéptido(s) marcador(es). 15 Por operativamente unido se entiende, que las dos secuencias de ácido nucleico están unidas de manera que, si se expresan, se produce la proteína de fusión de la amidasa enantio-selectiva con el polipéptido marcador en sus terminales N- y/o C-. El polipéptido marcador puede servir para muchos propósitos, por ejemplo, puede ser usado para aumentar la estabilidad o la solubilidad de la proteína de fusión, puede ser usado como una señal de secreción, la cual es una señal que dirige la proteína de fusión a un cierto compartimiento en la célula o puede ser usado para facilitar 20 la purificación de la proteína de fusión. Ejemplos de polipéptidos marcadores usados para facilitar la purificación de la proteína de fusión son los MBP- y los OST-tag. La purificación de una proteína de fusión con un MBP-tag o un GST-tag es por ejemplo descrito en F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, y K. Struhl eds., Protocolos Actuales en Biología Molecular, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, 1990. Una proteína de fusión con un MBP-tag puede por ejemplo ser producida en un vector pMAL (New England Biolabs, 25 Beverly, MA, USA), mientras que una proteína de fusión con un GST-tag puede ser producida en un vector pGEX (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ, USA) siguiendo el protocolo del suministrador respectivo.

Una secuencia de ácido nucleico descrita en la presente invención, por ejemplo la secuencia de ácido nucleico con la secuencia de SEQ ID: NO 1 puede ser aislada usando técnicas de biología molecular estándares y la información de 30 secuencia proporcionada ahí.

Por ejemplo, usando todo o una porción de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID: NO. 1 en *Ochrobactrum anthropi* NCIB 40321 como una sonda de hibridización una secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la invención puede ser aislado usando técnicas de hibridización y clonación estándares (por ejemplo, como es descrito en Sambrook, 35 J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Además, una secuencia de ácido nucleico que abarca toda o una porción de la SEQ ID: NO. 1 puede ser aislada por 40 la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores de oligonucleótidos sintéticos diseñados en base a la información de la secuencia contenida en la SEQ ID: NO. 1 o la SEQ ID: NO. 2, usando PCR en *Ochrobactrum anthropi* NCIB 40321 y pudiera también ser aislada si los cebadores de oligonucleótido son usados en un microorganismo que exhibe actividad enantio-selectiva.

Una secuencia de ácido nucleico descrita en la invención puede también ser amplificada usando por ejemplo ADN 45 genómico, cADN o alternativamente el mARN apropiado de un microorganismo que exhibe actividad de amidasa enantio-selectiva, como un patrón y cebadores de oligonucleótido apropiados basados en la información de la secuencia proporcionada ahí de acuerdo a las técnicas de amplificación estándares (RT)-PCR. El ácido nucleico así amplificado puede ser clonado en un vector apropiado y caracterizado por análisis de secuencia de ADN.

50 Por otra parte, los oligonucleótidos que corresponden a o hibridizables para secuencias de ácido nucleico de acuerdo a la invención pueden ser preparados mediante técnicas sintéticas estándares, por ejemplo usando un sintetizador de ADN automatizado.

Las secuencias de ácido nucleico descritas en la invención pueden ser clonadas en un vector apropiado y después 55 de la introducción en un hospedero apropiado, la secuencia puede ser expresada para producir las amidasas enantio-selectivas correspondientes de acuerdo a técnicas de expresión y clonación estándares, las cuales son conocidas por la persona versada en el arte (por ejemplo, como se describió en Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). La invención también se refiere a tales vectores que comprenden una secuencia de ácido 60 nucleico de acuerdo a la invención.

Los vectores apropiados son los vectores normalmente usados para clonación y expresión y son conocidos por las personas versadas en el arte. Ejemplos de vectores apropiados para la expresión en *E. coli* son dados en la tabla 1 en Makrides, S.C., Microbiological Reviews, Vol. 60, No. 3, (1996), 512-538. Preferiblemente, el vector contiene un 65 promotor aguas arriba del sitio de clonación contenido la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido con actividad amidasa, el cual puede ser activado después que el hospedero ha crecido para expresar el polipéptido correspondiente teniendo actividad amidasa. Los promotores, que pueden ser activados y desactivados son conocidos por la persona versada en el arte y son por ejemplo el promotor *Iac*, el promotor *araBAD*, los promotores T7, el

promotor *trc*, el promotor *tac* y el promotor *trp*. Particularmente útiles en el marco de la invención son por ejemplo los vectores como los descritos en WO 00/66751, por ejemplo pKAFssEC*trp* o pKAPssEC*aro* sin el inserto, el gen de la penicilina G acilasa. Hospederos apropiados son los hospederos normalmente usados para la clonación y expresión y son conocidos por la persona versada en el arte. Ejemplos de cepas hospederas apropiadas son por ejemplo las cepas 5 de *Escherichia coli*, por ejemplo *E. coli* TOP10F', TOP10, DH10B, DH5a, HB101, W3110, BL21(DE3) y BL21 (DE3) pLysS. Particularmente útiles en el marco de la invención son las cepas de *Escherichia coli* K-12, por ejemplo DH1, HB101, RV308, RR1, W3110, C600.

La selección del vector puede a veces depender de la selección del hospedero y viceversa. Si por ejemplo un vector 10 con el promotor *araBAD* está siendo usado, una cepa hospedera de *E. coli* que es incapaz de romper el inductor de arabinosa (ara-), es ampliamente preferido.

Alternativamente, las secuencias de ácido nucleico descritas en la invención pueden ser integradas en el genoma 15 de una célula hospedera, el cual normalmente no contiene una secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la invención y ser (sobre)expresadas. Esto puede ser hecho de acuerdo a los métodos conocidos por la persona versada en el arte. La invención también se relaciona con una célula hospedera, la cual normalmente no contiene una secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la invención, comprendiendo una secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la invención, preferiblemente a una célula hospedera que comprende un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la invención.

20 La invención también se relaciona con un proceso para la preparación del producto de expresión de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-5 donde en un primer paso la secuencia de ácido nucleico es introducida en un hospedero apropiado, el cual normalmente no contiene una secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la invención, y donde la secuencia de ácido nucleico es subsiguientemente expresada en dicho hospedero.

25 La introducción de una secuencia de ácido nucleico y la subsiguiente expresión son técnicas estándares conocidas por la persona versada en el arte.

La invención también se relaciona con un proceso para fermentación, que comprende una fase de alimentación 30 y una discontinua, de un microorganismo en un medio de fermentación, donde el microorganismo expresa un ácido nucleico de acuerdo a la invención y donde entre 0.5 y 50 mg/l de Zn<sup>+2</sup> del medio de fermentación (correspondiente a entre 7,7 $\mu$ M y 770  $\mu$ M) es alimentado durante la fermentación.

Típicamente, la fase alimentada es comenzada después de aproximadamente 10 horas. La cantidad de Zn<sup>+2</sup> de 0.5-35 50 mg/l del medio de fermentación puede ser alimentada de una vez al medio de fermentación, pero es preferible dosificada, ya que la adición de Zn<sup>+2</sup> de una vez eleva la formación de espuma en el medio de fermentación y la lisis del microorganismo después en la fermentación. El Zn<sup>+2</sup> puede ser dosificado en por ejemplo 5-10 porciones iguales, pero claro está es también posible dosificar el Zn<sup>+2</sup> en diferentes porciones durante la fase de alimentación. Preferiblemente, el Zn<sup>+2</sup> es continuamente alimentado al medio de fermentación. Si una alimentación continua es usada, es muy práctico combinar Zn<sup>+2</sup> con otros componentes en la alimentación.

40 Los iones Zn<sup>+2</sup> están por ejemplo presentes en las sales de zinc. En el proceso de acuerdo a la invención preferiblemente las sales de zinc que son bien solubles en agua (más de 0.1 moles por litro) son usadas, por ejemplo Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, ZnBr<sub>2</sub>, ZnI<sub>2</sub>.

45 El microorganismo usado en la fermentación pueden ser un microorganismo, que posee y exprese una secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la invención por naturaleza, pero es preferiblemente un hospedero en el cual la secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la invención es expresada, más preferiblemente sobre-expresada.

Ha sido encontrado que la actividad de amidasa enantio-selectiva de un producto de expresión de una secuencia 50 de ácido nucleico de acuerdo a la invención es también mejorada en presencia de entre 0.01 mM y 100 mM de Zn<sup>+2</sup>. Por lo tanto, la invención también se relaciona con un proceso para la preparación de un ácido carboxílico enantioméricamente enriquecido y/o una amida de un ácido carboxílico enantioméricamente enriquecido, en la que una mezcla de las amidas de los ácidos carboxílicos E- y L-correspondientes es contactada con un producto de expresión de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en presencia de entre 0 y 100 mM de Zn<sup>+2</sup> donde uno de los 55 enantiómeros de la amida de ácido carboxílico es enantio-selectivamente hidrolizado para formar el ácido carboxílico enantioméricamente enriquecido correspondiente, mientras que el otro enantiómero de la amida de ácido carboxílico permanece invariable. Si se desea, la amida de del ácido carboxílico enantioméricamente enriquecido remanente puede ser hidrolizada para formar el ácido enantioméricamente enriquecido correspondiente. La hidrólisis de la amida del ácido carboxílico remanente puede ser realizada por métodos conocidos en el arte por ejemplo bajo condiciones ácidas 60 o básicas, o de manera enzimática.

Preferiblemente, la hidrólisis enantio-selectiva catalizada por el producto de expresión de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la invención es realizada en presencia de entre 0,01 y 50, más preferiblemente entre 0.05 y 20 mM de Zn<sup>+2</sup>.

65 El pH al cual la hidrólisis enantio-selectiva catalizada por el producto de expresión de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la invención, tiene lugar no es crítico, preferiblemente la hidrólisis enantio-selectiva es llevada a cabo a un pH entre 5 y 9, más preferiblemente entre 6.5 y 8.5.

# ES 2 286 262 T3

La temperatura a la cual la hidrólisis enantio-selectiva en presencia de un producto de expresión de acuerdo a la invención tiene lugar es preferiblemente entre 10 y 75°C, más preferiblemente entre 30 y 65°C, en particular entre 40 y 60°C.

5 Como una mezcla, mezclas racémicas de amida del ácido D- y L-carboxílico pueden ser usadas, pero por supuesto es también posible usar mezclas aleatoriamente seleccionadas de la amida del ácido D- y L-carboxílico.

Ejemplos de amidas de ácido carboxílico apropiadas son: amidas del ácido  $\alpha$ -H- $\alpha$ -amino con 2-20 átomos de C o derivados de los mismos, como por ejemplo alanina amida, fenilglicina amida, fenilalanina amida, para-hidroxifenilglicina amida, prolina amida, valina amida, leucina amida, leucina terciaria amida, metionina amida, pralina amida, amida de ácido glutámico, amidas del ácido  $\alpha$ -H- $\alpha$ -hidroxi con 2-20 átomos de C, por ejemplo amida de ácido mandélico, amidas del ácido  $\alpha$ - $\alpha$ -dialquil con 2-20 átomos de C, por ejemplo amida de  $\alpha$ -metilvalina,  $\alpha$ -metilfenilglicina amida,  $\alpha$ -etilfenilglicina amida,  $\alpha$ -butilfenilglicina amida,  $\alpha$ -metilfenilalanina amida,  $\alpha$ -etilfenilalanina amida,  $\alpha$ -etil- $\alpha$ -butil glicina amida. Preferiblemente la tert-leucina o una metilfenilglicina es preparada en un proceso de acuerdo a la invención.

A modo de ilustración de la invención, los siguientes ejemplos han sido adicionados.

## 20 Ejemplos

### Ejemplo 1

25 *Fermentación de Escherichia coli K-12 expresando la secuencia de ácido nucleico presentada en la SEQ ID: NO. 1 con la adición de Zn<sup>+2</sup> al medio de fermentación en la fase de alimentación*

El siguiente medio de siembra fue preparado:

30	Extracto de levadura en polvo (DIFCO, Bacto <sup>TM</sup> )	38 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17.8 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.6 g
	NH <sub>4</sub> Cl	4.8 g
35	Agua destilada	1500 ml

40 El pH fue ajustado a 6.8 con NaOH acuoso. 100 y 200 ml de alícuotas fueron colocadas en frascos Erlenmeyer de 500 y 2000 ml y esterilizadas (20 min a 121°C). 1.1 ml de una solución de glucosa 50% (p/v) y 2.2 ml de neomicina (1.2 g/l) fueron asépticamente adicionados al frasco de 500 ml (fase de alimentación 1). 1 y 2 ml de la solución de 50% (p/v) de glucosa y neomicina (1.2 g/l) fueron adicionados al frasco de 2000 ml (fase de siembra 2).

45 El frasco Erlenmeyer de la fase siembra 1 fue entonces sembrado con 1.8 ml de una suspensión de glicerol/agua a 50% v/v de la cepa de *E. coli* K-12 que expresa la secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la SEQ ID: NO 1 y el conjunto fue cultivado e incubado durante 22 horas a 27°C bajo agitación orbital constante. Para expresar la secuencia de ácido nucleico presentada en la SEQ ID NO. 1, en la cepa de *E. coli* K-12 RV308, la secuencia de ácido nucleico fue amplificada por PCR usando cebadores específicos de amidasa con extensiones 5' conteniendo un sitio de restricción (*Nde*I para el cebador hacia adelante y *Sma*I para el cebador inverso). El fragmento obtenido fue clonado en un derivado del vector de expresión de *E. coli* pKEC<sub>trp</sub> en el sitio de la secuencia que codifica para la penicilina G acilasa de *E. coli* usando enzimas de restricción *Nde*I y *Sma*I. El vector de expresión derivado usado es similar a la construcción pKEC<sub>trp</sub>, cuya construcción ha sido descrita en WO 00/66751, excepto que la misma contiene el promotor *aro* de *E. coli* en vez del promotor *trp*. El frasco Erlenmeyer 1 de fase de siembra completo fue usado para inocular el frasco Erlenmeyer de 2000 ml de la fase de siembra 2. La fase de siembra 2 fue cultivada e incubada por 3 horas a 27°C bajo agitación orbital constante.

55 2% (v/v) de la fase de siembra 2 fue usado para inocular 6.4 l del medio de la fase discontinua en un fermentador de vidrio de 20 l. El medio de la fase discontinua tuvo la siguiente composición:

60	Gistex <sup>®</sup> LS pasta	24.6 g/l
	Ácido Cítrico	10 g/l
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g/l
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.1 g/l
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.5 g/l
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.169 g/l
65	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9.0 g/l
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.006 g/l

# ES 2 286 262 T3

(Continuación)

5	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.004 g/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.004 g/l
	Antiespumante: Basfidon 86/013	pocas gotas
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>1</sup>	8.1 g/l
10	Dextrosa <sup>2</sup>	11.4 g/l
	Neomicina <sup>2</sup>	0.012 g/l
	Tiamina	0.014 g/l

El medio de la fase discontinua fue esterilizado a 121°C por 65 minutos después de ajustar el pH a 4,5 (con NaOH). Los componentes del medio marcado con <sup>1</sup> y <sup>2</sup> fueron cada uno disueltos separadamente y la solución comprendiendo los componentes marcados con <sup>1</sup> fueron esterilizados a 121°C por 65 minutos y las soluciones comprendiendo los componentes marcados con <sup>2</sup> fueron filtradas-esterilizadas. Ambas fueron adicionadas asépticamente al medio. Antes de transferir la fase de siembra 1, el pH del medio de la fase discontinua fue ajustado a pH 7,0. La fermentación fue conducida a 27°C bajo agitación constante y condiciones de aeración óptimas. Entre 50 y 54 horas, la temperatura de la fermentación fue linealmente disminuida durante 4 horas desde 27 a 25°C y mantenida en ese valor hasta el final de la fermentación.

Durante la fermentación (fase de alimentación y discontinua), se permitió que el pH variara entre 7.00 y 7.30. La fase discontinua fue terminada con el inicio de la alimentación 1 y la alimentación 2 (inicio de la fase de alimentación) cuando el pH alcanzó el nivel de 7.15. En el momento, la fuente de carbón fue agotada. La fase discontinua tuvo una duración de aproximadamente 9 horas. La alimentación 1 tuvo la siguiente composición:

30	Dextrosa	670 g/l
	Tiamina <sup>1</sup>	0.18 g/l
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	14.4 g/l
	Prolina <sup>1</sup>	6.1 g/l
	Monoglutamato de sodio	12.2 g/l
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	0.022 g/l

35 La alimentación 1 fue preparada como sigue. La dextrosa fue primero disuelta. Alrededor de 0.4 ml/l de HCl 4N fue adicionado a la solución de dextrosa. La solución fue esterilizada (121°C por 30 minutos). La tiamina, el MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, la prolina y el monoglutamato de sodio y el ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O fueron disueltos separadamente y la solución fue filtrada-esterilizada antes de la adición (asépticamente) a la solución de dextrosa. El perfil usado para introducir la alimentación 1 en el medio de la fase discontinua es dado abajo en la tabla 1.

40

TABLA 1

*Perfil de alimentación usado para introducir la alimentación 1*

45

Tiempo	Punto fijado [g <sub>alim</sub> / (l <sub>inic</sub> * h) ]
0 (inicio alimentación) - 14 horas	2.59 x e <sup>(0.07 x Time)</sup>
14-40 horas	6.91 + 0.48 x (Tiempo -14)
40 horas - fin de la fermentación	19.3

La alimentación 2 tuvo la siguiente composición:

60	Gistex® LS pasta	300 g/l
----	------------------	---------

La alimentación 2 fue preparada como sigue. El extracto de pasta de levadura fue primero disuelto en agua. Subsiguientemente, el pH fue ajustado a 4,5 ± 0,1. La solución fue esterilizada (121°C por 30 minutos). El perfil usado para introducir la alimentación 2 en el medio de la fase discontinua es dado abajo en la tabla 2. Por "Tiempo" en los perfiles de la tabla 1 y 2 se entiende "horas después del inicio de la alimentación".

## ES 2 286 262 T3

TABLA 2  
*Perfil usado para introducir la alimentación 2*

Tiempo	Punto fijado [g <sub>alim</sub> /(l <sub>inic</sub> ·h)]
0 (Inicio Alimentación) - 14 horas	0.81 x e <sup>(0.07 x Tiempo)</sup>
14 - 34 horas	2.15 + 0.15 x (Tiempo - 14)
34 - 38 horas	5.15
38 horas - fin de la fermentación	0

La alimentación 1 y la alimentación 2 constituyen el medio de la fase de alimentación. La fermentación fue terminada después de 120 horas.

La fermentación fue repetida con la excepción de que en la alimentación 1 el ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O estaba presente.

La actividad de la L-amidasa en el caldo de fermentación (medio de fermentación y células) después de la fase de alimentación fue determinada para ambas fermentaciones de la manera descrita abajo:

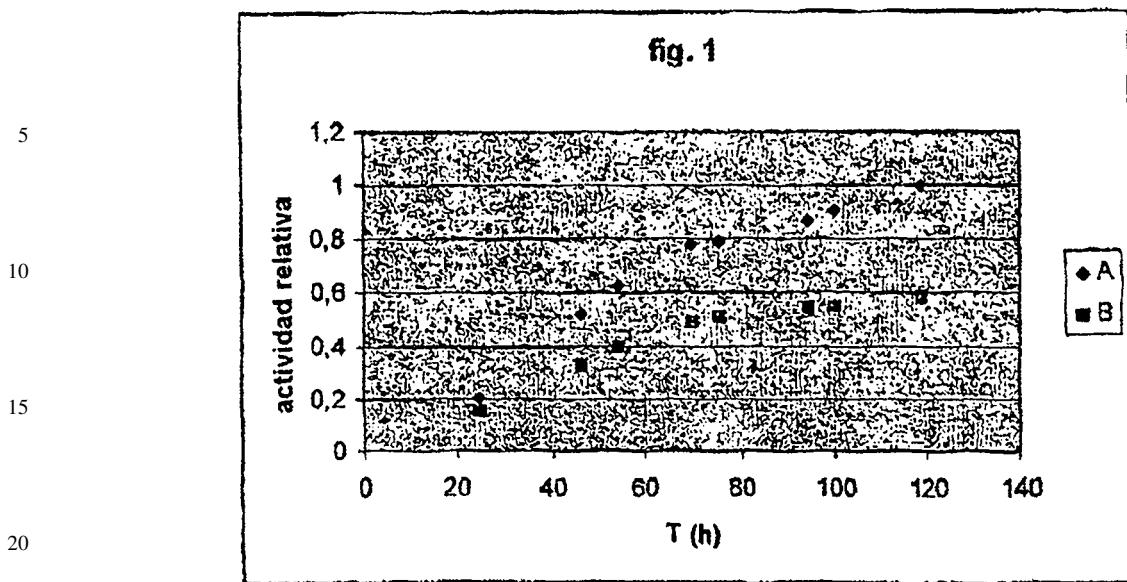
*Análisis de la actividad de la L-amidasa de las muestras del caldo de fermentación (medio de fermentación con células) obtenidas de la fermentación de Escherichia coli K-12 que expresa la secuencia de ácido nucleico presentada en la SEQ ID: NO. 1 con Zn<sup>2+</sup> en la alimentación 1 y sin Zn<sup>2+</sup> en la alimentación 1*

1.5 ml del reactivo de incubación (conteniendo 1.1% en peso de L-fenilglicina amida, 0.11 M del buffer HEPES-NaOH, pH 8.0 y 1.1 mM de MnSO<sub>4</sub>·1H<sub>2</sub>O) fue calentado en un baño de agua a 55°C. Después de 10 minutos, 100 µl de una solución muestra (conteniendo caldo de fermentación diluido en 20 mM de HEPES-NaOH, pH 7.5/2 mM DTT) fue adicionado al reactivo de incubación calentado. Después de la incubación del reactivo de incubación combinado con la solución muestra por 20 minutos, la reacción fue detenida adicionando 100 µl del reactivo de incubación combinado a 1.5 ml del reactivo de detención (53 mM de ácido fosfórico). La mezcla de reacción detenida fue centrifugada por 5 minutos a 14,000 rpm. El sobrenadante fue analizado con HPLC bajo las siguientes condiciones:

columna: nucleosil 120-3C18 (125 x 4 mm)  
 detector de longitud de onda: 220 nm  
 flujo: 1.0 ml/min  
 volumen de inyección: 20 µl  
 eluente: 100 mM de buffer de phosphate pH 3.0

Los tiempos de retención L-fenilglicina y L-fenilglicina amida son respectivamente alrededor de 1.8 y 2.7 minutos.

El área bajo el pico HPLC correspondiente a la fenilglicina fue calculado y después la corrección para el factor de dilución del caldo de fermentación, comparado al área bajo el pico de la fenilglicina de otras muestras. Las áreas de pico relativas de las muestras son iguales a la actividad relativa de la L-amidasa, la cual es la actividad de las muestras comparadas una con otra. La actividad relativa de la L-amidasa (rel. act.) de las muestras de la fermentación con una alimentación 1 con Zn<sup>2+</sup> (A) y con una alimentación 1 sin Zn<sup>2+</sup> (B) es presentada en la figura 1 en la cual la actividad relativa ha sido ploteada contra T (h), el tiempo (en horas después del inicio de la fase discontinua) al cual las muestras fueron tomadas.



De la figura 1, puede ser observado que si el  $Zn^{+2}$  es alimentado a la fermentación en la fase de alimentación, se produce más actividad L-amidasa.

#### *Preparación de la solución de la enzima LAM0011 a partir de la fermentación con $Zn^{+2}$ en la alimentación 1*

El caldo de fermentación de la fermentación con  $Zn^{+2}$  en la alimentación 1 fue tratado con 4 g/l de octanol en la fermentación para matar los microorganismos y fue homogenizado dos veces mediante homogenización a alta presión (600-700 bars). Después de la homogenización el caldo fue flokulado mediante la adición de 10% en volumen, calculado sobre el volumen del caldo de una solución al 10% de C577. 10% en vol, calculado sobre el volumen del caldo de Dicalite 448, un ayudante del filtrado, fue adicionado. La pasta resultante fue filtrada sobre un filtro de prensa de membrana y lavada con 1 volumen de torta de agua del proceso. La torta de biomasa fue enviada a incineración. El filtrado fue filtrado en unas placas de filtro Seitz (tamaños 5-15  $\mu m$ ) seguido por placas de filtración germ de 0.1-0.3 micrómetros. El filtrado resultante fue almacenado en contenedores y congelado hasta el uso.

#### *Preparación de la solución de la enzima LAM0001 a partir de la fermentación sin $Zn^{+2}$ en la alimentación 1*

El caldo de fermentación de la fermentación sin  $Zn^{+2}$  en la alimentación 1 fue tratado con 4 g/l de octanol en la fermentación para matar los microorganismos y fue homogenizado dos veces mediante homogenización a alta presión (600-700 bars). Después de la homogenización el caldo fue flokulado por adición de 10% en volumen del caldo de una solución de C577 al 10%. 10% en volumen, calculado del volumen del caldo, de Dicalite 448, un ayudante del filtrado, fue adicionado. La pasta resultante fue filtrada sobre un filtro de prensa de membrana y lavada con 2,2 volúmenes de torta de agua del proceso. La torta de biomasa fue enviada a incineración. El filtrado fue filtrado en unas placas de filtro Seitz de tamaños 5-15 micrómetros seguido por placas de filtración germ de 0.1-0.3 micrómetros. En lo adelante el filtrado resultante fue concentrado a un factor 3 usando membranas de Polisulfona 50 kD. El retenido fue lavado con un cuarto del volumen del retenido de agua RO. El retenido fue nuevamente filtrado sobre placas de filtro Seitz de tamaños 5-15 micrómetros seguido por placas de filtración germ de 0.1-0.3 micrómetros. El filtrado resultante fue almacenado en contenedores y congelado hasta el uso en la reacción de la solicitud (ejemplos 2-5).

#### Ejemplo 2

#### *Hidrólisis enantio-selectiva de DL- $\alpha$ -metilfenilglicina amida en presencia de diferentes concentraciones de $Zn^{+2}$ a pH 6,5 usando L-amidasa de *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321*

El efecto de la concentración de  $Zn^{+2}$  en la reacción de hidrólisis de DL- $\alpha$ -metilfenilglicina amida con la L-amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321, fue determinada llevando a cabo esta reacción en presencia de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 y 9.0 mM de  $Zn^{+2}$ . Como control, una reacción sin  $Zn^{+2}$  adicional fue llevada a cabo también.

Para este experimento, fueron llenadas botellas con 25 g de la mezcla de reacción, cada una de la mezcla de reacción conteniendo 2.5 g de DL- $\alpha$ -metilfenilglicina amida (concentración final 10% en peso), 46  $\mu l$  de *O. anthropi* NCIMB 40321 lote no. LAM0011, y sin  $ZnSO_4$  o 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, o 9.0 mM de  $ZnSO_4$  adicionales. El pH del conjunto de la mezcla de reacción fue 6.5. Las reacciones fueron comenzadas con la adición del líquido con enzimas.

Todas las mezclas de reacción fueron incubadas en un vibrador orbital a 55°C y 200 rpm. Directamente después de la adición de la enzima (t= 0 horas) y después de 1, 4 y 11 horas las muestras de 1 g fueron tomadas y transferidas a frascos conteniendo 4 g de  $H_3PO_4$  1 M para detener inmediatamente la reacción. La cantidad exacta de la muestra

## ES 2 286 262 T3

y de la solución de detención fueron determinadas por peso. Despues de la filtración sobre un filtro de 0.22  $\mu$ M, las concentraciones de  $\alpha$ -metilfenilglicina y  $\alpha$ -metilfenilglicina amida fueron determinadas por HPLC de acuerdo al siguiente protocolo:

5 Columna: Inertsil ODS-3 (3 $\mu$ m) 50 mm \* 4.6 mm ID  
10 Eluente: 50 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>NaOH, pH=2.5  
Flujo: 0.8 ml/min  
15 Temperatura: 40°C  
V<sub>in</sub>: 15  $\mu$ L  
Detección: UV 210 nm

Los resultados de este experimento son dados en la tabla 3, donde las conversiones (cantidad de amino ácido formado comparado con la cantidad total de amino ácido amida de inicio) de las reacciones son dados en conversiones relativas; la conversión más alta fue establecida en 100.

20 TABLA 3

25 *Influencia de la concentración de Zn<sup>2+</sup> sobre la reacción de hidrólisis de DL- $\alpha$ -metilfenilglicina amida por la L-  
30 amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321 (lote no. LAM 0011)*

Entrada	[Zn <sub>2</sub> ] (mM)	Después de la conversión		
		1 h	4 h	11 h
A	9.0	28	85	100
B	3.0	24	87	100
C	1.0	19	83	100
D	0.3	16	74	97
E	0.1	11	61	92
F	0	1.4	3.1	5.3

45 De la tabla 3 puede concluirse que la presencia de Zn<sup>2+</sup> es ampliamente preferible para la actividad de la *O. anthropi* L-amidasa hacia la DL- $\alpha$ -metilfenilglicina amida. Sin Zn<sup>2+</sup> adicional, ninguna reacción de hidrólisis de este sustrato ocurre (ver entrada F).

### Ejemplo 3

50 *Hidrólisis enantio-selectiva de DL- $\alpha$ -metilfenilglicina amida en presencia de diferentes iones de metal divalentes a pH 6.5 usando L-amidasa de *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321*

55 En una reacción similar establecida como para el ejemplo 2, se investigó si el Zn<sup>2+</sup> adicional tenía un efecto beneficioso sobre la conversión de DL- $\alpha$ -metilfenilglicina amida con L-amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321 la que había sido fermentada sin un exceso de Zn<sup>2+</sup>. Las reacciones de hidrólisis fueron llevadas a cabo en presencia de cantidades equimolares de Mn<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup>. Además, una reacción de control fue llevada a cabo usando la L-amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321 fermentada en presencia de un exceso de Zn<sup>2+</sup>.

60 Las botellas fueron llenadas con 25 g de mezcla de reacción, cada mezcla de reacción conteniendo 2.5 g de DL- $\alpha$ -metilfenilglicina amida (concentración final 10% en peso), 240 $\mu$ l de la preparación LAM0001 de L-amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321, y 1 mM de MnSO<sub>4</sub> o ZnSO<sub>4</sub>. Una tercera mezcla de reacción fue preparada conteniendo (además del sustrato), 1 mM de Zn<sup>2+</sup> y 92 $\mu$ l de la preparación LAM0011 de L-amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321 (92 $\mu$ l LAM0011 corresponde a la actividad de la L-amidasa de 240 $\mu$ l de LAM0001). La incubación del sustrato, el muestreo y los análisis fueron todos llevados a cabo como se describió en el ejemplo 2. Los resultados de este experimento son dados en la tabla 4, donde las conversiones (cantidad de amino ácido formado comparado al amino ácido amida de inicio) de las reacciones son dados en conversiones relativas; la conversión más alta fue establecida en 100.

# ES 2 286 262 T3

TABLA 4

Efecto de la adición del  $Zn^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  sobre la reacción hidrólisis de la DL- $\alpha$ -metilfenilglicina amida por la L-amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321 fermentada en ausencia de  $Zn^{+2}$  en la alimentación I (lote no. LAM0001) y fermentada con  $Zn^{+2}$  en la alimentación I (lote no. LAM 0011)

5

10

Entrada	Preparación de la enzima	Ión de metal	Después de la conversión		
			1 h	3 h	5 h
A	LAM0001	$Mn^{+2}$	11	33	55
B	LAM0001	$Zn^{+2}$	33	94	100
C	LAM0011	$Zn^{+2}$	36	93	100

20

De la tabla 4 puede concluirse que en presencia de 1 mM de  $Zn^{+2}$ , las tasas de conversión de DL- $\alpha$ -metilfenilglicina amida con las enzimas fermentadas con y sin  $Zn^{+2}$  extra son similares y son ambas más altas que la conversión en presencia de 1 mM de  $Mn^{+2}$ .

25

## Ejemplo 4

### Hidrólisis enantio-selectiva de DL-*tert*-leucina amida en presencia de diferentes iones de metal divalentes a pH 7.0 por L-amidasa de *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321

30

De manera similar a la establecida para el ejemplo 2, fue determinado el efecto de la presencia de cantidades equimolares de  $Mn^{+2}$   $Zn^{+2}$ , y  $Mg^{+2}$  en la reacción de hidrólisis de DL-*tert*-leucina amida con la L-amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321. Como control, una reacción sin ningún ión de metal divalente adicional fue realizada.

35

Para llevar a cabo este experimento, fueron llenadas botellas con 25 g de la mezcla de reacción, cada mezcla de reacción conteniendo 3,13 g de DL-*tert*-leucina amida (concentración final 12.5% en peso), 1.45 ml de L-amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321 (lote no. LAM0011), y 1.0 mM de  $ZnSO_4$ ,  $MgSO_4$  o  $MnSO_4$ . Además, una reacción separada fue llevada a cabo sin ningún ión de metal divalente adicional. El pH de todas las mezclas de reacción fue 7.0. Las reacciones comenzaron con la adición del líquido con la enzima.

40

Todas las mezclas de reacción fueron incubadas en un vibrador orbital a 55°C y 150 rpm. Directamente después de la adición de la enzima ( $t = 0$  horas) y después de 1,3 y 6,7 horas las muestras de 1 g fueron tomadas y transferidas a frascos conteniendo 4 g de  $H_3PO_4$  1 M para detener inmediatamente la reacción. La cantidad exacta de la muestra y de la solución de detención fueron determinadas por peso. Después de la filtración sobre un filtro de 0.22  $\mu$ M, las concentraciones de *tert*-leucina amida fueron determinadas por HPLC de acuerdo al siguiente protocolo:

45

- Columna: Inertsil ODS-3 (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 $\mu$ ), suministrado por Varian Chrompack
- Eluente: 99% vol de  $H_3PO_4$  50 mM, pH=2.3 usando NaOH 1N + 1% en vol de acetonitrilo
- 50 Flujo: 1.0 ml/min
- Temperatura: 30°C
- 55  $V_{in}$ : 20 $\mu$ l
- Detección: detección de fluorescencia después de la derivación de la post-columna con OPA/MCE<sup>(a)</sup> ( $\lambda_{ex}$  365 nm y  $\lambda_{em}$  >420 nm).

60

(a) la derivación de la post-columna fue llevada a cabo en un serpentín de reacción (2 m x 0.25 mm I.D.) a temperatura ambiente usando buffer de borato 0.4 M pH 10 contenido o-  
ftalaldehído (OPA) y 2-mercaptopropano (MCE). El flujo de la derivación del reactivo fue 1.0 ml/min.

65

El reactivo fue preparado disolviendo primero 49.46 g  $H_3BO_3$  y 35 g de KOH en 2 litros de agua Milli-Q, seguido por el ajuste del pH a 10 usando KOH 1M. Luego 1.6 g de OPA (en 20 ml de etanol) y 2 ml de MCE fueron adicionados a este buffer de borato.

# ES 2 286 262 T3

Los resultados de este experimento son dados en la tabla 5, donde las conversiones (la cantidad de amino ácido formado comparado con la cantidad de amino ácido amida de inicio) de las reacciones son dadas en conversiones relativas, la conversión más alta fue establecida en 100.

5

TABLA 5

*Influencia de la presencia de diferentes iones de metal divalentes sobre la reacción de hidrólisis de DL-tert-leucina amida por la L-amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321 (lote no. LAM 0011)*

10

Entrada	Ión de metal	Después de la conversión		
		1 h	3 h	6.7 h
A	Zn <sup>+2</sup>	15	56	100
B	Mg <sup>+2</sup>	8.9	32	77
C	ninguno	8.1	30	69

25 La información de la tabla 5 muestra claramente que en presencia de 1 mM de Zn<sup>+2</sup> una reacción de hidrólisis más rápida de DL-tert-leucina amida por la L-amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321 es obtenida que en presencia de una cantidad equimolar de Mg<sup>+2</sup> o en ausencia de un ión de metal divalente adicional.

30 Ejemplo 5

*Hidrólisis enantio-selectiva de DL-tert-leucina amida en presencia de Zn<sup>+2</sup> a diferentes valores de pH con L-amidasa de *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321*

35 Para investigar la influencia del pH en la actividad de la L-amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321 en la hidrólisis enantio-selectiva de DL-tert-leucina amida, reacciones en presencia y ausencia de 1 mM de Zn<sup>+2</sup> fueron llevados a cabo a pH 7.0, 8.0 y 9.0.

40 El establecimiento experimental completo fue idéntico al establecimiento del ejemplo 3. Los resultados de estos experimentos son presentados en la tabla 6.

40

TABLA 6

*Influencia del pH de la mezcla de reacción en la reacción de hidrólisis de la DL-tert-leucina amida en presencia y ausencia de 1 mM de ZnSO<sub>4</sub> por la L-amidasa de *O. anthropi* NCIMB 40321 (lote no. LAM 0011)*

45

Entrada	pH	Zn <sup>+2</sup> (1 nM)	Después de la conversión		
			1 h	3 h	6.7 h
A	7	+	15	56	100
B		-	8.1	30	69
C	8	+	14	46	94
D		-	11	38	82
E	9	+	14	43	93
F		-	13	39	77

65

# ES 2 286 262 T3

## REIVINDICACIONES

1. Proceso para la fermentación, que comprende una fase de alimentación y una discontinua, de un microorganismo en un medio de fermentación, donde el microorganismo expresa un ácido nucleico que codifica para una amidasa enantio-selectiva con una secuencia de amino ácido, cuya secuencia de amino ácido tiene al menos 70% de identidad con la SEQ ID NO: 2 y donde entre 0.5 y 50 mg/l de  $Zn^{+2}$  del medio de fermentación es alimentado durante la fermentación.
- 10 2. Proceso para la preparación de un ácido carboxílico enantioméricamente enriquecido y/o una amida de ácido carboxílico enantioméricamente enriquecido, en el que una mezcla de las amidas de los ácidos D- y L-carboxílicos correspondientes es contactada con un producto de expresión siendo una amidasa enantio-selectiva con una secuencia de amino ácido, cuya secuencia de amino ácido tiene al menos 70% de identidad con la SEQ ID NO: 2 en presencia de entre 0.01 mM y 100 mM de  $Zn^{+2}$ , donde uno de los enantiómeros de la amida del ácido carboxílico es enantio-selectivamente hidrolizada para formar el ácido carboxílico enantioméricamente enriquecido correspondiente.
- 15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 286 262 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> DSM NV

5 <120> secuencias de ácido nucleico que codifican para amidasas enantio-selectivas

<130> 20594WO

10 <140>

<141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 945

<212> ADN

<213> *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321

25 <400> 1

30 atgtgcaata attggcattt caccattcac ggccggcato atcatttcgg ctgggacaac 60  
tgcgttcaggc cggtgtgaaac ggtcgcgcgc ggctcgacc tgaaattcga atgtctggac 120  
agcggcgccag gccactatca tgcggcgccgc acagtgcgcg atgtgtcgac gatggatttt 180  
tccaaaggatca atccgggtac cggccccatc ttctcgatcg gagccaaacc gggcgatgtc 240  
ctgaaaatca ccatecacca gttcgagccca tcaggcttcg gctggacggc aaatattccg 300  
ggcttcggtc ttctcgccga cgacttcaag gaaccggcgc tagcattgtg gaactacaat 360  
cccacaacgc tggagccaggc actcttcggc gagcgtgcgc gctgtccgcgt gaagccgttc 420  
gccccggaaaccat tccggcgatcg acggccggaa aaggggcctgc attcgtcgat accaccggt 480  
cgtgtccggcg gcaatctcgat cttcccgat ctgcagccg gaaccacgct ttatctggcg 540  
atcgaagtcg aaggcgctt gtttccatt ggtgataacc atgcgcaca gggcgacggc 600  
gaagtgtcg gcaaccgcattt cggaaaggcgcg atgaatgtcg ctctgacgct ggatctcattc 660  
40 aaggataacgc cactgaagat gccccggttc accacgcccgg ggccagtgcg gggcacctc 720  
gataccaaagg gtacgaaatg caccacgggt atcgggtccg atctgtggga aggccgcgaaa 780  
gccccccctt ccaacatgtat cggacccctt tgccagacgc agaactcaa cccgggtggat 840  
gcctatatgc tctgtcgcc ctgcgggtatgc ctgcgtatca gcgaaatcgat cgatcagccg 900  
45 aactgggtcg tatacggttctat cttcccgat tccgttttcg aataa 945

<210> 2

<211> 314

50 <212> PRT

<213> *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321

55

60

65

## ES 2 286 262 T3

&lt;400&gt; 2

Met	Cys	Asn	Asn	Cys	His	Tyr	Thr	Ile	His	Gly	Arg	His	His	Phe
1				5					10					15

5	Gly	Trp	Asp	Asn	Ser	Phe	Gln	Pro	Ala	Glu	Thr	Val	Ala	Pro	Gly	Ser
					20				25					30		

10	Thr	Leu	Lys	Phe	Glu	Cys	Leu	Asp	Ser	Gly	Ala	Gly	His	Tyr	His	Arg
					35			40				45				

15	Gly	Ser	Thr	Val	Ala	Asp	Val	Ser	Thr	Met	Asp	Phe	Ser	Lys	Val	Asn
					50			55			60					

20	Pro	Val	Thr	Gly	Pro	Ile	Phe	Val	Asp	Gly	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Val
					65			70			75			80		

25	Leu	Lys	Ile	Thr	Ile	His	Gln	Phe	Glu	Pro	Ser	Gly	Phe	Gly	Trp	Thr
					85			90			95					

30	Ala	Asn	Ile	Pro	Gly	Phe	Gly	Leu	Leu	Ala	Asp	Asp	Phe	Lys	Glu	Pro
					100			105			110					

35	Ala	Leu	Ala	Leu	Trp	Asn	Tyr	Asn	Pro	Thr	Thr	Leu	Glu	Pro	Ala	Leu
					115			120			125					

40	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Arg	Val	Pro	Leu	Lys	Pro	Phe	Ala	Gly	Thr	Ile
					130			135			140					

45	Gly	Val	Ala	Pro	Ala	Glu	Lys	Gly	Leu	His	Ser	Val	Val	Pro	Pro	Arg
					145			150			155			160		

50	Arg	Val	Gly	Gly	Asn	Leu	Asp	Ile	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Thr
					165			170			175					

55	Leu	Tyr	Leu	Pro	Ile	Glu	Val	Glu	Gly	Ala	Leu	Phe	Ser	Ile	Gly	Asp
					180			185			190					

60	Thr	His	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Gly	Glu	Val	Cys	Gly	Thr	Ala	Ile	Glu
					195			200			205					

65	Ser	Ala	Met	Asn	Val	Ala	Leu	Thr	Leu	Asp	Leu	Ile	Lys	Asp	Thr	Pro
					210			215			220					

70	Leu	Lys	Met	Pro	Arg	Phe	Thr	Thr	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Arg	His	Leu
					225			230			235			240		

75	Asp	Thr	Lys	Gly	Tyr	Glu	Val	Thr	Thr	Gly	Ile	Gly	Ser	Asp	Leu	Trp
					245			250			255					

80	Glu	Gly	Ala	Lys	Ala	Ala	Leu	Ser	Asn	Met	Ile	Asp	Leu	Leu	Cys	Gln
					260			265			270					

85	Thr	Gln	Asn	Leu	Asn	Pro	Val	Asp	Ala	Tyr	Met	Leu	Cys	Ser	Ala	Cys
					275			280			285					

90	Gly	Asp	Leu	Arg	Ile	Ser	Glu	Ile	Val	Asp	Gln	Pro	Asn	Trp	Val	Val
					290			295			300					

95	Ser	Phe	Tyr	Phe	Pro	Arg	Ser	Val	Phe	Glu						
					305			310								