

POLIPÉPTIDOS Y POLINUCLEÓTIDOS CETORREDUCTASA

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Patente, N° de Serie 62/906.268, presentada el 26 de septiembre de 2019, que se incorpora por referencia en toda su extensión, para todos los efectos.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS, TABLA O PROGRAMA DE COMPUTACIÓN

[0002] El Listado de Secuencias que se presenta simultáneamente bajo 37 C.F.R. §1.821 en un formato legible por computadora (CRF) a través de EFS-Web como nombre de archivo CX8-195WO2_ST25.txt se incorpora aquí por referencia. La copia electrónica del Listado de Secuencias se creó el 23 de septiembre de 2020, con un tamaño de archivo de 664 kilobytes.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0003] La presente invención provee enzimas cetorreductasa modificadas que tienen propiedades mejoradas en comparación con una enzima cetorreductasa salvaje de origen natural, así como polinucleótidos que codifican las enzimas cetorreductasa modificadas, células huésped capaces de expresar las enzimas cetorreductasa modificadas y métodos para usar las enzimas cetorreductasa modificadas.

ANTECEDENTES

[0004] Las enzimas que pertenecen a la clase de las cetorreductasas (KRED, por *KetoREDuctase*, en inglés) o carbonil reductasas (EC1.1.1.184) son útiles para la síntesis de alcoholes con actividad óptica a partir del correspondiente sustrato de cetona proquiral y por reducción estereoselectiva de los correspondientes sustratos de aldehído racémico. Las KRED suelen convertir los sustratos de cetona y aldehído en el correspondiente producto alcohol, pero también pueden catalizar la reacción inversa, la oxidación de un sustrato de alcohol en el correspondiente producto cetona/aldehído. La reducción de cetonas y aldehídos y la oxidación de alcoholes por enzimas como la KRED requiere un cofactor, más comúnmente dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) o fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADPH), y dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) para la reacción de

oxidación. El NADH y el NADPH sirven como donantes de electrones, mientras que el NAD⁺ y el NADP⁺ sirven como aceptores de electrones. Con frecuencia se observa que las cetorreductasas y las alcohol deshidrogenasas aceptan el cofactor fosforilado o no fosforilado (en su estado oxidado y reducido), pero muy rara vez ambos.

[0005] Con el fin de evitar muchos procedimientos de síntesis química para la producción de compuestos clave, cada vez se emplean más las cetorreductasas para la conversión enzimática de diferentes sustratos de cetonas y aldehídos en productos de alcohol quirales. En estas aplicaciones se pueden emplear células enteras que expresen la cetorreductasa para realizar reducciones biocatalíticas de cetonas y aldehídos o para la oxidación biocatalítica de alcoholes, o mediante el uso de enzimas purificadas en aquellos casos en los que la presencia de múltiples cetorreductasas en células enteras podría afectar de manera adversa la estereopureza y el rendimiento del producto que se desea.

[0006] El "amargor" es un atributo de sabor clave de la cerveza que normalmente deriva del agregado de lúpulo (flores de la planta *Humulus lupulus L.*). Los iso- α -ácidos se forman durante el proceso de elaboración de la cerveza por la isomerización de las humulonas, que son compuestos naturales en las glándulas de lupulina de la planta del lúpulo.

Específicamente, los seis principales iso- α -ácidos son responsables del sabor amargo: cis-isohumulona, trans-isohumulona, cis-isocohumulona, trans-isocohumulona, cis-isoadhumulona y trans-isoadhumulona.

[0007] Sin embargo, los iso- α -ácidos no son estables a la luz, y la formación de 3-metil-2-buten-1-ol (3-MBT) inducida por la luz le da a la cerveza un pronunciado sabor y aroma a zorrino [*skunky*] o de fotólisis [*light-struck*]. Esto hace que sea necesario envasar la cerveza en botellas marrones o latas. Otra solución consiste en crear cervezas totalmente estables a la luz mediante la reducción de un grupo carbonilo del iso- α -ácido para producir el correspondiente dihidro-(rho)-iso- α -ácido. Estos dihidro-(rho)-iso- α -ácidos reducidos son estables y se pueden envasar en botellas transparentes o verdes.

[0008] Sin embargo, actualmente, los iso- α -ácidos solo se pueden convertir en dihidro-(rho)-iso- α -ácidos usando productos químicos tóxicos, peligrosos y de calidad no alimentaria (por ejemplo, borohidruro de sodio). Por lo tanto, una conversión segura y de calidad alimentaria de los iso- α -ácidos en dihidro-(rho)-iso- α -ácidos tendría un valor comercial considerable.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0009] La presente invención provee enzimas cetorreductasa modificadas que tienen propiedades mejoradas en comparación con una enzima cetorreductasa salvaje de origen natural, así como polinucleótidos que codifican las enzimas cetorreductasa modificadas, células huésped capaces de expresar las enzimas cetorreductasa modificadas y métodos para usar las enzimas cetorreductasa modificadas.

[0010] La presente invención provee enzimas cetorreductasa (“KRED”) modificadas con actividad enzimática mejorada en la conversión de iso- α -ácidos a los correspondientes dihidro-(rho)-iso- α -ácidos en comparación con las cetorreductasas salvajes de origen natural de *Lactobacillus kefir* (SEQ ID NO: 2) o en comparación con otras enzimas cetorreductasa modificadas, incluyendo a los polipéptidos cetorreductasa modificados de las SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328 y/o 330.

[0011] En algunas formas de realización adicionales, las enzimas modificadas tienen una o más propiedades mejoradas además de una actividad enzimática mejorada. Las mejoras en las propiedades de las enzimas incluyen, pero de manera no taxativa, a: actividad mejorada a través de un rango de sustratos, actividad mejorada a altas concentraciones de sustrato y actividad mejorada a bajas concentraciones de cofactor.

[0012] La presente invención provee variantes de cetorreductasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328, y/o 330.

[0013] La presente invención también provee variantes de cetorreductasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 12, 21, 87, 93, 97, 110, 145, 148, 152, 153, 194, 196, 197, 200, 206, 212, y 226, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 4. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 12I, 21R, 87L, 93D, 93M, 93T, 93V, 97G, 110I, 145C, 145G, 145M, 145S, 148I, 152G, 152S, 153C, 153R, 153V, 194H, 194N, 194R, 196H, 196K, 196R, 197G, 197R, 200L, 200Q, 200R, 206V, 212S, y 226L, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 4. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre V12I, L21R,

V87L, I93D, I93M, I93T, I93V, K97G, L110I, L145C, L145G, L145M, L145S, V148I, T152G, T152S, L153C, L153R, L153V, P194H, P194N, P194R, L196H, L196K, L196R, D197G, D197R, E200L, E200Q, E200R, M206V, T212S, e I226L, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 4.

[0014] La presente invención también provee variantes de cetorredutasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 12/110/145/152, 12/145, 87/110/145, 87/110/145/194, 87/145/194, 110, 110/145/152/197, 110/145/194, 145, 145/152, 145/197/226, y 152, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 6. En algunas formas de realización, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 12I/110I/145M/152G, 12I/145M, 87L/110I/145M, 87L/110I/145M/194H, 87L/110I/145M/194N, 87L/145M/194H, 110I, 110I/145M/152G/197G, 110I/145M/194H, 145M, 145M/152G, 145M/197G/226L, y 152S, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 6. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre V12I/L110I/L145M/T152G, V12I/L145M, V87L/L110I/L145M, V87L/L110I/L145M/P194H, V87L/L110I/L145M/P194N, V87L/L145M/P194H, L110I, L110I/L145M/T152G/D197G, L110I/L145M/P194H, L145M, L145M/T152G, L145M/D197G/I226L, y T152S, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 6.

[0015] La presente invención también provee variantes de cetorredutasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 80, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 17, 21, 46, 56, 72, 79, 95, 101, 110, 152, 162, 190, 198, 210, 211, y 227, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 80. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 17Q, 17S, 21A, 46V, 56C, 72A, 79L, 95I, 101C, 101L, 101T, 110V, 152K, 152L, 162G, 190A, 198A, 198Q, 210F, 210W, 211R, y 227V, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 80. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas

comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre L17Q, L17S, L21A, K46V, V56C, K72A, E79L, V95I, D101C, D101L, D101T, I110V, T152K, T152L, A162G, P190A, D198A, D198Q, T210F, T210W, L211R, y C227V, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 80.

[0016] La presente invención también provee variantes de cetorreductasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 80, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 17, 79, 157, 159, 190/191/194, 190/194, 191/194, 194, 198, y 211, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 80. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 17M, 17Q, 17S, 79L, 157C, 159T, 190A/191T/194E, 190A/194E, 191T/194E, 194E, 198A, 198Q, y 211R, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 80. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre L17M, L17Q, L17S, E79L, N157C, S159T, P190A/I191T/P194E, P190A/P194E, I191T/P194E, P194E, D198A, D198Q, y L211R, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 80.

[0017] La presente invención también provee variantes de cetorreductasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 104, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 17/46/190, 17/46/198/211, 17/96/194/198, 17/190/198, 46/190/194/198, y 46/194/198, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 104. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 17M/46V/190A, 17M/46V/198A/211R, 17M/96V/194E/198Q, 17M/190A/198A, 17M/190A/198Q, 46V/190A/194E/198Q, y 46V/194E/198Q, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 104. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre Q17M/K46V/P190A, Q17M/K46V/D198A/L211R, Q17M/I96V/P194E/D198Q, Q17M/P190A/D198A, Q17M/P190A/D198Q,

K46V/P190A/P194E/D198Q, y K46V/P194E/D198Q, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 104.

[0018] La presente invención también provee variantes de cetorredutasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 172, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 45, 101, 179, 194, 204, 226, y 231, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 172. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 45L, 101R, 101Y, 179M, 194E, 204Q, 226V, y 231G, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 172. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre E45L, D101R, D101Y, Y179M, P194E, E204Q, I226V, y A231G, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 172.

[0019] La presente invención también provee variantes de cetorredutasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 186, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 95/96/97/150/153/205, 95/96/150/153/205/206/211/249, 95/97/143/145/150/153/202/205, 95/97/143/145/150/153/249, 95/97/150/153, 95/97/150/153/202/205/206, 95/150/153/205/206/211, 95/150/153/205/211, 95/150/153/206/249, 96/150/153, 96/150/153/206, 97/150/153, 97/150/153/205, 97/150/153/205/211, 97/150/153/206, 143/144/145/150/153/202/205/249, 143/145/150/153, 144/145/150/153/205/206, 144/150/153, 144/150/153/202/205/206, 145/150/153/206/249, 145/153/211, 150/153/202/206/249, 150/153/205/211, 150/153/206/211, 150/153/211, y 150/153/249, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 186. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 95A/96A/97A/150A/153A/205A, 95A/96A/150A/153A/205A/206A/211A/249A, 95A/97A/143A/145A/150A/153A/202A/205A, 95A/97A/143A/145A/150A/153A/249A, 95A/97A/150A/153A, 95A/97A/150A/153A/202A/205A/206A, 95A/150A/153A/205A/206A/211A, 95A/150A/153A/205A/211A,

95A/150A/153A/206A/249A, 96A/150A/153A, 96A/150A/153A/206A, 97A/150A/153A, 97A/150A/153A/205A, 97A/150A/153A/205A/211A, 97A/150A/153A/206A, 143A/144A/145A/150A/153A/202A/205A/249A, 143A/145A/150A/153A, 144A/145A/150A/153A/205A/206A, 144A/150A/153A, 144A/150A/153A/202A/205A/206A, 145A/150A/153A/206A/249A, 145A/153A/211A, 150A/153A/202A/206A/249A, 150A/153A/205A/211A, 150A/153A/206A/211A, 150A/153A/211A, y 150A/153A/249A, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 186. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre V95A/I96A/K97A/D150A/L153A/M205A, V95A/I96A/D150A/L153A/M205A/M206A/L211A/W249A, V95A/K97A/S143A/M145A/D150A/L153A/W202A/M205A, V95A/K97A/S143A/M145A/D150A/L153A/W249A, V95A/K97A/D150A/L153A, V95A/K97A/D150A/L153A/W202A/M205A/M206A, V95A/D150A/L153A/M205A/M206A/L211A, V95A/D150A/L153A/M205A/L211A, V95A/D150A/L153A/M206A/W249A, I96A/D150A/L153A, I96A/D150A/L153A/M206A, K97A/D150A/L153A, K97A/D150A/L153A/M205A, K97A/D150A/L153A/M205A/L211A, K97A/D150A/L153A/M206A, S143A/I144A/M145A/D150A/L153A/W202A/M205A/W249A, S143A/M145A/D150A/L153A, I144A/M145A/D150A/L153A/M205A/M206A, I144A/D150A/L153A, I144A/D150A/L153A/W202A/M205A/M206A, M145A/D150A/L153A/M206A/W249A, M145A/L153A/L211A, D150A/L153A/W202A/M206A/W249A, D150A/L153A/M205A/L211A, D150A/L153A/M206A/L211A, D150A/L153A/L211A, y D150A/L153A/W249A, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 186.

[0020] La presente invención también provee variantes de cetorreductasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 186, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 7/147, 103/147, 110, 110/179/194, 147, y 249, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 186. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 7Q/147I, 103R/147I, 110V, 110V/179M/194E, 147I, y

249Y, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 186. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre H7Q/L147I, T103R/L147I, I110V, I110V/Y179M/P194E, L147I, y W249Y, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 186.

[0021] La presente invención también provee variantes de cetorreductasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 194, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 7/12/54/110/150/153/194/205/211/249, 12/54/72/110/150/152/153/194/205/211/249, 12/72/101/103/110/152/249, 12/72/110/147/152/204, 45/54/72/110/152/194/204, 72/110/147/150/152/153/194/205/211/249, y 110/150/153/179/194/205/211/249, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 194. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 7Q/12I/54S/110V/150D/153L/194E/205M/211L/249Y, 12I/54S/72T/110V/150D/152M/153L/194E/205M/211L/249Y, 12I/72S/101Y/103Q/110V/152M/249Y, 12I/72S/110V/147I/152M/204Q, 45L/54S/72S/110V/152M/194E/204Q, 72S/110V/147M/150D/152M/153L/194E/205M/211L/249Y, y 110V/150D/153L/179M/194E/205M/211L/249Y, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 194. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se seleccionado entre H7Q/V12I/T54S/I110V/A150D/A153L/P194E/A205M/A211L/W249Y, V12I/T54S/K72T/I110V/A150D/T152M/A153L/P194E/A205M/A211L/W249Y, V12I/K72S/R101Y/T103Q/I110V/T152M/W249Y, V12I/K72S/I110V/L147I/T152M/E204Q, E45L/T54S/K72S/I110V/T152M/P194E/E204Q, K72S/I110V/L147M/A150D/T152M/A153L/P194E/A205M/A211L/W249Y, y I110V/A150D/A153L/Y179M/P194E/A205M/A211L/W249Y, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 194.

[0022] La presente invención también provee variantes de cetorreductasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más

de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 252, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 7/12/54/179/249, 7/152, 12/54/72/152/179/249, 40, 54/72, 72/147/152/179/249, y 249, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 252. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 7Q/12I/54S/179Y/249Y, 7Q/152M, 12I/54S/72T/152M/179Y/249Y, 40E, 54S/72S, 72S/147M/152M/179Y/249Y, y 249Y, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 252. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre H7Q/V12I/T54S/M179Y/W249Y, H7Q/T152M, V12I/T54S/K72T/T152M/M179Y/W249Y, H40E, T54S/K72S, K72S/L147M/T152M/M179Y/W249Y, y W249Y, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 252.

[0023] La presente invención también provee variantes de cetorreductasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 270, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 92/93, 150/152, 150/152/153, y 194/195, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 270. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 92A/93E, 150D/152A/153L, 150Y/152A, 150Y/152S, y 194S/195A, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 270. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre G92A/I93E, A150D/M152A/A153L, A150Y/M152A, A150Y/M152S, y E194S/R195A, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 270.

[0024] La presente invención también provee variantes de cetorreductasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 272, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 92/93/95, 93, 93/95, 93/95/109, 93/95/109/114, 93/95/114, 93/109/114, y 114, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 272. En algunas formas de

realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 92A/93D/95R, 93A/95K/109R, 93A/95R/109D/114T, 93D/95R, 93E/109R/114A, 93M, 93R/95A/114T, y 114A, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 272. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre G92A/I93D/V95R, I93A/V95K/K109R, I93A/V95R/K109D/N114T, I93D/V95R, I93E/K109R/N114A, I93M, I93R/V95A/N114T, y N114A, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 272.

[0025] La presente invención también provee variantes de cetorredutasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 286, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 12/45/72/109/249, 12/45/93/249, 12/45/249, 12/109/249, 45/72/249, 45/109/249, 45/249, 96, y 145/150, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 286. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 12I/45E/72T/109D/249Y, 12I/45E/93A/249Y, 12I/45E/249Y, 12I/109D/249Y, 45E/72T/249Y, 45E/109D/249Y, 45E/249Y, 96A, y 145A/150A, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 286. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre V12I/L45E/S72T/K109D/W249Y, V12I/L45E/I93A/W249Y, V12I/L45E/W249Y, V12I/K109D/W249Y, L45E/S72T/W249Y, L45E/K109D/W249Y, L45E/W249Y, I96A, y M145A/Y150A, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 286.

[0026] La presente invención también provee variantes de cetorredutasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 328, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 150, 150/151, 150/195, y 195, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 328. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 150A, 150A/151A, 150A/195S, 195A, y 195S, donde las posiciones están

numeradas con referencia a SEQ ID NO: 328. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se seleccionado entre Y150A, Y150A/P151A, Y150A/R195S, R195A, y R195S, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 328.

[0027] La presente invención también provee variantes de cetorredutasa modificadas que tienen por lo menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 330, y por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución en una o más posiciones que se seleccionan entre las posiciones 12/72/109/195, 17/73/200, 17/115, 68/72/101/152/205, 68/72/124, 68/72/124/152, 68/101/124/152/205, 68/124/205, 72/109/152/195, 72/109/195, 72/152, 72/152/195, 72/195, 73, 73/147, 79, 93, 93/95/145/195, 93/109/114/145/195, 93/195, 95/195, 96/108/147/200, 96/194/200, 101/205, 145/195, 147, 147/200, 192, 194, 194/200, 195, 198, y 200, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 330. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre 12V/72S/109K/195R, 17A/73V/200P, 17A/115Q, 68E/72D/101K/152Q/205L, 68R/72D/101Q/152Q/205L, 68R/72R/124E, 68R/72R/124E/152Q, 68R/101Q/124E/152Q/205L, 68R/124E/205L, 72D/152Q, 72K/152M/195R, 72K/195R, 72S/109K/152M/195R, 72S/109K/195R, 73V, 73V/147I, 79A, 93A, 93A/95R/145A/195R, 93A/109K/114T/145A/195R, 93A/195R, 95R/195R, 96P/108S/147I/200P, 96P/194N/200P, 101M/205L, 145A/195A, 147I, 147I/200P, 192R, 194N, 194N/200P, 195R, 198G, 198R, y 200P, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 330. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorredutasa modificadas comprenden por lo menos una sustitución o un conjunto de sustitución que se selecciona entre I12V/T72S/D109K/S195R, M17A/L73V/E200P, M17A/L115Q, A68E/T72D/R101K/A152Q/A205L, A68R/T72D/R101Q/A152Q/A205L, A68R/T72R/L124E, A68R/T72R/L124E/A152Q, A68R/R101Q/L124E/A152Q/A205L, A68R/L124E/A205L, T72D/A152Q, T72K/A152M/S195R, T72K/S195R, T72S/D109K/A152M/S195R, T72S/D109K/S195R, L73V, L73V/L147I, E79A, I93A, I93A/V95R/M145A/S195R, I93A/D109K/N114T/M145A/S195R, I93A/S195R, V95R/S195R, I96P/R108S/L147I/E200P, I96P/E194N/E200P, R101M/A205L, M145A/S195A, L147I, L147I/E200P, K192R, E194N, E194N/E200P, S195R, Q198G, Q198R, y E200P, donde las posiciones están numeradas con referencia a SEQ ID NO: 330.

[0028] La presente invención también provee variantes de cetorreductasa modificadas que comprenden secuencias polipeptídicas que comprenden secuencias con por lo menos un 90% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328, y/o 330. En algunas formas de realización, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden secuencias polipeptídicas que comprenden secuencias con por lo menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328, y/o 330. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden secuencias polipeptídicas que se establecen en las SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328, y/o 330. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden secuencias polipeptídicas que codifican variantes que se proveen en las Tablas 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 17-2, 18-1, 19-1, 19-2, 20-1, 20-2, 21-1, 22-1 y/o 24-1. En algunas formas de realización adicionales, las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden secuencias polipeptídicas que se seleccionan entre las secuencias de numeración par que se establecen en las SEQ ID NO: 6 a 412.

[0029] La presente invención también provee secuencias polinucleotídicas modificadas que codifican las variantes de cetorreductasa modificadas que se proveen en la presente. En algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótidos modificada comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene por lo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia que se selecciona entre las secuencias de numeración impar que se establecen en las SEQ ID NO: 5 a 411. La presente invención también provee vectores que comprenden las secuencias de polinucleótidos modificadas que codifican las variantes de cetorreductasa modificadas que se proveen en la presente. En algunas formas de realización, los vectores comprenden además por lo menos una secuencia de control. En algunas formas de realización, los vectores comprenden las SEQ ID NO: 413 y/o 414.

[0030] La presente invención también provee células huésped que comprenden los vectores que comprenden polinucleótidos que codifican las variantes de cetorreductasa modificadas que se proveen en la presente.

[0031] La presente invención también provee métodos para producir las variantes de cetorreductasa modificadas que se proveen en la presente, que comprenden cultivar las células huésped que se proveen en la presente en condiciones en que la célula huésped produce la variante de cetorreductasa modificada. En algunas formas de realización, los

métodos comprenden además el paso de recuperar la variante de cetorreductasa modificada producida por la célula huésped. En algunas formas de realización adicionales, los métodos para producir las variantes de cetorreductasa modificadas comprenden cultivar una célula huésped que comprende el vector de las SEQ ID NO: 413 y/o 414.

[0032] La presente invención también provee variantes de cetorreductasa modificadas inmovilizadas.

[0033] La presente invención también provee composiciones que comprenden por lo menos una variante de cetorreductasa modificada que se provee en la presente. En algunas formas de realización, las composiciones comprenden por lo menos una variante de cetorreductasa modificada inmovilizada que se provee en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0034] En la Figura 1 se provee un perfil de reacción de HPLC típico que compara la actividad KRED de los polipéptidos de las SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 80 a altas concentraciones de sustrato.

[0035] En la Figura 2 se proveen los resultados de los experimentos que se describen en el Ejemplo 11, de actividad KRED (% de conversión) de variantes seleccionadas a altas concentraciones de sustrato y bajas concentraciones de NADP.

[0036] En la Figura 3 se provee un perfil de reacción de HPLC típico que representa a la especie Rho producida por el polipéptido de la SEQ ID NO: 194.

[0037] En la Figura 4 se provee un perfil de reacción de HPLC típico que compara la actividad KRED de los polipéptidos de las SEQ ID NO: 328 y SEQ ID NO: 330 a altas concentraciones de sustrato y bajas concentraciones de NADP. Para la Figura 4: Líneas continuas = 4 g/l de enzima; Líneas discontinuas = 1 g/l de enzima; Rombo = SEQ ID NO: 328; Cuadrados vacíos = SEQ ID NO: 330.

[0038] En la Figura 5 se provee un perfil de reacción de HPLC típico que compara la actividad KRED de los polipéptidos de las SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 348, SEQ ID NO: 346 y SEQ ID NO: 356 a altas concentraciones de sustrato y bajas concentraciones de NADP. Para la Figura 5: Triángulo vacío = SEQ ID NO: 270; Triángulo lleno = SEQ ID NO: 328; círculo vacío = SEQ ID NO: 348; círculo lleno = SEQ ID NO: 356; Cuadrado vacío = SEQ ID NO: 330; Cuadrado lleno = SEQ ID NO: 346.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0039] La presente invención provee enzimas cetorreductasa modificadas que tienen propiedades mejoradas en comparación con una cetorreductasa salvaje de origen natural, así como polinucleótidos que codifican las enzimas cetorreductasa modificadas, células huésped capaces de expresar las enzimas cetorreductasa modificadas y métodos para usar las enzimas cetorreductasa modificadas.

Definiciones

[0040] Con referencia a la presente invención, los términos técnicos y científicos que se utilizan en las descripciones de la presente tendrán los significados con que comúnmente los entienden los expertos en la materia, a no ser que se los defina específicamente de otra manera. Por lo tanto, es la intención que los siguientes términos tengan los siguientes significados. Todas las patentes y publicaciones, incluyendo a todas las secuencias descritas en las patentes y publicaciones a las que se hace referencia en la presente se incorporan expresamente por referencia. A no ser que se indique otra cosa, la práctica de la presente invención se relaciona con técnicas convencionales que se utilizan comúnmente en biología molecular, fermentación, microbiología y campos relacionados, que son conocidas por los expertos en la técnica. A no ser que en la presente se los defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente tienen el mismo significado con que comúnmente lo entiende un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque para llevar a la práctica o probar la presente invención se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los que se describen en la presente, se describen los métodos y materiales preferidos. Por cierto, no es la intención limitar la presente invención a la metodología, los protocolos ni los reactivos particulares que se describen en la presente, ya que estos pueden variar, dependiendo del contexto en que se utilicen. Los títulos que se proveen en la presente no se deben entender como limitaciones de los diversos aspectos ni formas de realización de la presente invención.

[0041] Sin embargo, para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se definen una serie de términos. Los rangos numéricos incluyen a los números que definen el rango. Por lo tanto, cada rango numérico que se describe en la presente pretende abarcar a todo rango numérico más estrecho que dentro de dicho rango numérico más amplio, como si en la presente se divulgasen expresamente todos dichos rangos numéricos más estrechos. También es la intención que cada límite numérico máximo (o mínimo) que se divulga en la presente incluya a cada límite numérico mínimo (o máximo), como si en la presente se hubiesen escrito expresamente dichos límites numéricos mínimos (o máximos).

[0042] Tal como se usa en la presente, el término "que comprende" y sus cognados se usan con su sentido inclusivo (es decir, equivalente al término "que incluye" y sus correspondientes cognados).

[0043] Tal como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, el singular "una", "un" y "el/la" incluyen a las referencias en plural, a no ser que el contexto indique claramente otra cosa. De esa manera, por ejemplo, la referencia a una "célula huésped" incluye a una pluralidad de dichas células huésped.

[0044] A no ser que se indique otra cosa, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha con una orientación de 5' a 3' y las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha con una orientación amino a carboxi, respectivamente.

[0045] Los títulos que se proveen en la presente no son limitaciones de los diversos aspectos ni formas de realización de la invención que se pueden obtener por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. Por lo tanto, los términos que se definen a continuación se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto.

[0046] "Cetorreductasa" y "KRED" en la presente se usan como sinónimos para hacer referencia a un polipéptido con la capacidad enzimática de reducir un grupo carbonilo a su correspondiente alcohol. Más específicamente, los polipéptidos cetorreductasa de la invención son capaces de reducir una mezcla de iso- α -ácidos a los correspondientes dihidro-(rho)-iso- α -ácidos, según se muestra en el Esquema 1. Las enzimas cetorreductasa de la presente invención se obtienen del KRED natural de *L. kefir* (SEQ ID NO: 2). Sin embargo, los términos "KRED" y "cetorreductasa" no se limitan a eso y pueden hacer referencia a enzimas naturales o a enzimas derivadas de diversas especies de bacterias, plantas, algas y/o especies animales. Las enzimas pueden ser sintéticas, artificiales o producidas por diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica.

[0047] En la presente, "iso- α -ácidos" o "iso" se usan como sinónimos para hacer referencia a los isómeros, epímeros, diastereómeros, tautómeros y enantiómeros de isohumulona, un compuesto derivado del lúpulo, las flores de la planta del lúpulo, *Humulus lupulus* L. Los "iso- α -ácidos" o "iso" incluyen, pero de manera no taxativa, a: cis-isohumulona, trans-isohumulona, cis-isocohumulona, trans-isocohumulona, cis-isoadhumulona y trans-isoadhumulona. Los "iso- α -ácidos" o "iso" también incluyen a cualquier isómero, epímero, diastereómero, tautómero, enantiómero u otros derivados o compuestos similares naturales o sintéticos que tengan propiedades químicas similares, específicamente, que confieran un sabor amargo o amargor a la cerveza u otras bebidas alcohólicas o similares. Esto incluye a

todos los isómeros, epímeros, diastereómeros, enantiómeros o tautómeros del núcleo de ácido tetrónico de la isohumulona.

[0048] En la presente, "dihidro-(rho)-iso- α -ácidos" o "rho" se usan como sinónimos para hacer referencia a los compuestos creados por la reducción de un grupo carbonilo de un "iso- α -ácido" o "iso", según se lo define en la presente. Los "dihidro-(rho)-iso- α -ácidos" o "rho" se pueden producir a partir de "iso- α -ácidos" o "iso" mediante la conversión por uno o más polipéptidos KRED, según se describe en la presente.

[0049] Tal como se los usa en la presente, los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan como sinónimos aquí para indicar un polímero de por lo menos dos aminoácidos unidos covalentemente por un enlace amida, independientemente de la longitud o la modificación posterior a la traducción (por ejemplo, glicosilación, fosforilación, lipidación, miristilación, ubiquitinación, etc.). Esta definición incluye a los D- y L-aminoácidos, y las mezclas de D- y L-aminoácidos.

[0050] Tal como se usa en la presente, "polinucleótido" y "ácido nucleico" se refieren a dos o más nucleósidos unidos entre sí de manera covalente. El polinucleótido puede estar compuesto en toda su extensión por ribonucleósidos (es decir, ARN), compuesto en toda su extensión por 2'-desoxirribonucleótidos (es decir, ADN) o mezclas de ribonucleósidos y 2'-desoxirribonucleósidos. Mientras que normalmente los nucleósidos estarán unidos mediante conexiones fosfodiéster estándar, los polinucleótidos pueden incluir una o más conexiones no estándar. El polinucleótido puede ser de una sola hebra o de hebra doble, o puede incluir tanto regiones de una sola hebra como regiones de hebra doble. Además, aunque normalmente un polinucleótido estará compuesto por bases nitrogenadas codificantes naturales (es decir, adenina, guanina, uracilo, timina y citosina), puede incluir una o más bases nitrogenadas modificadas y/o sintéticas (por ejemplo, inosina, xantina, hipoxantina, etc.). Preferiblemente, dichas nucleobases modificadas o sintéticas serán nucleobases codificantes.

[0051] Tal como se usa en la presente, "secuencia codificante" se refiere a la parte de un ácido nucleico (por ejemplo, un gen) que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína.

[0052] Tal como se usa en la presente, "de origen natural" o "de tipo salvaje" se refiere a la forma que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica de origen natural o de tipo salvaje es una secuencia presente en un

organismo que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por manipulación humana.

[0053] Tal como se los usa en la presente, "no natural" o "modificado" o "recombinante" cuando se usan con referencia por ejemplo, a una célula, ácido nucleico o polipéptido, se refieren a un material o a un material que corresponde a la forma natural o nativa del material, que ha sido modificado de una manera tal que de otra forma no existiría en la naturaleza, o que es idéntico al mismo pero se ha producido o derivado a partir de materiales sintéticos y/o por manipulación usando técnicas recombinantes. Algunos ejemplos no limitantes incluyen, de manera no taxativa, a: 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 otra manera se expresarían en un nivel diferente.

[0054] Tal como se los usa en la presente, "porcentaje de identidad de secuencia", "porcentaje de identidad" e "identidad porcentual" se refieren a comparaciones entre secuencias de polinucleótidos o secuencias de polipéptidos, y se determinan comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales aparece una base de ácido nucleico o un residuo aminoácido idénticos en ambas secuencias o donde hay una base de ácido nucleico o residuo aminoácido alineado con un hueco para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones apareadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. La determinación de la óptima alineación y del porcentaje de identidad de secuencia se realiza utilizando los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 (véase, por ejemplo, Altschul y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 [1990]; y Altschul y colaboradores, *Nucleic Acids Res* 3389-3402, [1977]). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

[0055] En resumen, los análisis BLAST incluyen primero la identificación de pares de secuencias de puntaje alto (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden con algún puntaje de umbral T de valor positivo o la satisfacen cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina umbral de puntaje de palabras del vecindario (Altschul y

colaboradores, citado anteriormente). Estas coincidencias iniciales de palabras del vecindario actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Las coincidencias de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia siempre y cuando se pueda aumentar el puntaje de alineación acumulativo. Los puntajes acumulativos se calculan usando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntaje de penalización para residuos con falta de coincidencia; siempre < 0). Para calcular el puntaje acumulativo para las secuencias de aminoácidos se utiliza una matriz de puntajes. La extensión de las coincidencias de palabra en cada dirección se detiene cuando el puntaje acumulativo de alineación cae en una cantidad X respecto de su máximo valor alcanzado; cuando el puntaje acumulativo llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntaje negativo; o cuando se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa 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 las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntaje BLOSUM62 (véase, por ejemplo, Henikoff y Henikoff, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10915 [1989]).

[0056] En la técnica hay disponibles y se conocen muchos otros algoritmos que funcionan de manera similar al BLAST, y proporcionan el porcentaje de identidad para dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede realizar utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica (por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 [1981]; mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 [1970]; por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 [1988]; y/o mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos [GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software GCG Wisconsin]), o mediante inspección visual, utilizando métodos comúnmente conocidos en el arte. Además, para la determinación de la alineación de secuencias y el porcentaje de identidad de secuencias se pueden emplear los programas BESTFIT o GAP en el paquete de software GCG Wisconsin (Accelrys, Madison WI), utilizando los parámetros predeterminados provistos.

[0057] Tal como se usa en la presente, "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia definida con la que se compara otra secuencia. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, un segmento de un gen o secuencia polipeptídica de longitud completa. Por lo general, una secuencia de referencia tiene por lo menos 20 residuos de nucleótidos o aminoácidos de longitud, por lo menos 25 residuos de longitud, por lo menos 50 residuos de longitud, o la longitud completa del ácido nucleico o polipéptido. Dado que cada uno de dos polinucleótidos o polipéptidos (1) pueden comprender una secuencia (es decir, una parte de la secuencia completa) que es similar entre las dos secuencias, y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre las dos secuencias, normalmente las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos o polipéptidos se realizan comparando secuencias de los dos polinucleótidos en una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. El término "secuencia de referencia" no se usa con la intención de limitarse a secuencias de tipo salvaje y puede incluir secuencias modificadas o alteradas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una "secuencia de referencia" puede ser una secuencia de aminoácidos previamente alterada o modificada.

[0058] Tal como se usa en la presente, "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de por lo menos aproximadamente 20 posiciones contiguas de nucleótidos o residuos aminoácidos donde una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia de por lo menos 20 nucleótidos o aminoácidos contiguos y donde la parte de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no incluye adiciones ni 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 pueden ser ventanas más largas.

[0059] Tal como se usa en la presente, cuando se usan "correspondiente a", "referencia a" o "con relación a" en el contexto de la numeración de una determinada secuencia de aminoácidos o polinucleótidos, se refieren a la numeración de los residuos de una secuencia de referencia específica cuando dicha determinada secuencia de aminoácidos o polinucleótidos se compara con la secuencia de referencia. En otras palabras, el número del residuo o la posición del residuo de un determinado polímero se designa con respecto a la secuencia de referencia en lugar de la posición numérica real del residuo dentro de la secuencia de aminoácidos o polinucleótidos en cuestión. Por ejemplo, una determinada

secuencia de aminoácidos, por ejemplo la de una cetorreductasa modificada, se puede alinear con una secuencia de referencia introduciendo huecos para optimizar las coincidencias de los residuos entre las dos secuencias. En estos casos, aunque los huecos estén presentes, la numeración del residuo en la secuencia de aminoácidos o polinucleótidos en cuestión se realiza con respecto a la secuencia de referencia con que se la ha alineado. Tal como se usa en la presente, una referencia a una posición de residuo, tal como "X_n", según se describe más adelante, se debe interpretar como una referencia a "un residuo correspondiente a", a no ser que se indique específicamente otra cosa. De esa manera, por ejemplo, "X₉₄" se refiere a cualquier aminoácido en la posición 94 en una secuencia polipeptídica.

[0060] Tal como se usa en la presente, "estereoselectividad" se refiere a la formación preferente de un estereoisómero en una reacción química o enzimática con respecto a la formación de otro estereoisómero u otro conjunto de estereoisómeros. La estereoselectividad puede ser parcial, donde se favorece la formación de un estereoisómero sobre la de otro, o puede ser completa donde solo se forma un estereoisómero. Cuando los estereoisómeros son enantiómeros, la estereoselectividad se denomina enantioselectividad, es decir la fracción (que típicamente se informa como porcentaje) de un enantiómero en la suma de ambos enantiómeros. En este campo la misma comúnmente se informa de manera alternativa (típicamente como un porcentaje) como el exceso enantiomérico (e.e.) calculado de acuerdo con la fórmula:
$$\frac{[\text{enantiómero principal} - \text{enantiómero secundario}]}{[\text{enantiómero principal} + \text{enantiómero secundario}]}$$
. Cuando los estereoisómeros son diastereómeros, la estereoselectividad se denomina diastereoselectividad, que es la fracción (que típicamente se informa como porcentaje) de un diastereómero en una mezcla de dos diastereómeros, y de manera alternativa comúnmente se informa como el exceso diastereomérico (d.e.). El exceso enantiomérico y el exceso diastereomérico son dos tipos de exceso estereomérico. También se debe entender que la estereoselectividad no se limita a estereoisómeros individuales y que se la puede describir para conjuntos de estereoisómeros.

[0061] Tal como se usa en la presente, "altamente estereoselectivo" se refiere a una reacción química o enzimática que es capaz de convertir un sustrato en su producto de alcohol quiral correspondiente, con un exceso estereomérico de por lo menos aproximadamente 75%.

[0062] Tal como se usa en la presente, "aumento de la actividad enzimática" y "aumento de la actividad" se refieren a una propiedad mejorada de una enzima modificada, que puede ser representada 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

en producto (por ejemplo, porcentaje de conversión de la cantidad inicial de sustrato en producto en un período de tiempo específico usando una cantidad específica de cetorreductasa) en comparación con una enzima de referencia. En los Ejemplos se proveen algunos ejemplos de métodos para determinar la actividad enzimática. Cualquier propiedad relacionada con la actividad enzimática puede verse afectada, incluyendo a las propiedades enzimáticas clásicas K_m , V_{max} o k_{cat} , cuyos cambios pueden llevar a un aumento de la actividad enzimática. La actividad cetorreductasa se puede medir mediante cualquiera de los ensayos estándar que se utilizan para medir cetorreductasas, tales como el cambio en la concentración de sustrato o producto, o el cambio en la concentración del cofactor (en ausencia de un sistema de regeneración de cofactor). Las comparaciones de las actividades enzimáticas se realizan usando una preparación definida de enzima, un ensayo definido en condiciones establecidas y uno o más sustratos definidos, según se describe de manera más detallada en la presente. Por lo general, cuando se comparan las enzimas en lisados celulares, se determina el número de células y la cantidad de proteína analizada, 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 que está presente en los lisados.

[0063] Tal como se usa en la presente, "conversión" se refiere a la transformación enzimática de un sustrato en el correspondiente producto.

[0064] Tal como se usa en la presente, "porcentaje de conversión" se refiere al porcentaje del sustrato que se convierte en el producto dentro de un período de tiempo en condiciones específicas. De esa manera, por ejemplo, la "actividad enzimática" o "actividad" de un polipéptido cetorreductasa se puede expresar como "porcentaje de conversión" del sustrato en el producto.

[0065] Tal como se los usa en la presente, "termoestable" o "térmicamente estable" se usan como sinónimos para hacer referencia a un polipéptido que es resistente a la inactivación cuando se expone a un conjunto de condiciones térmicas (por ejemplo, 40-80 °C) durante un período de tiempo (por ejemplo, entre 0,5 y 24 horas) en comparación con la enzima sin tratar, reteniendo así un cierto nivel de actividad residual (por ejemplo, entre más del 60 % y 80 %, por ejemplo) luego de ser expuesta a altas temperaturas.

[0066] Tal como se usa en la presente, "estable en solventes" se refiere a la capacidad de un polipéptido de mantener una actividad similar (por ejemplo, entre más de 60 % y 80 %) luego de ser expuesta a concentraciones variables (por ejemplo, 5-99 %) de solvente. En comparación con la enzima sin tratar.

[0067] Tal como se los usa en la presente, "diferencia de aminoácidos" o "diferencia de residuos" se refieren a una diferencia en el residuo aminoácido en una posición de una secuencia polipeptídica con respecto al residuo aminoácido en una posición correspondiente en una secuencia de referencia. Por lo general, las posiciones de las diferencias de aminoácidos aquí se denominan "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 residuos en la posición X40 en comparación con la SEQ ID NO: 2" se refiere a una diferencia entre los residuos aminoácidos en la posición del polipéptido correspondiente a la posición 40 de la SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, si el polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 2 tiene una histidina en la posición 40, entonces una "diferencia de residuo en la posición X40 en comparación con la SEQ ID NO: 2" se refiere a una sustitución (reemplazo) de un aminoácido de cualquier residuo que no sea histidina en la posición del polipéptido correspondiente a la posición 40 de la SEQ ID NO: 2. En la presente, en la mayoría de los casos la diferencia de residuo aminoácido específico en una posición se indica como "XnY", donde "Xn" especifica la posición correspondiente según se describió anteriormente, e "Y" es el identificador de una sola letra del aminoácido que se encuentra en el polipéptido modificado (es decir, el residuo diferente al del polipéptido de referencia). En algunos casos, la presente invención también provee diferencias de aminoácidos específicos 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 del residuo de la sustitución en la secuencia del polipéptido modificado. En algunos casos, un polipéptido de la presente invención puede incluir una o más diferencias de residuos aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia, lo que se indica mediante una lista de las posiciones específicas donde están presentes las diferencias de residuos con respecto a la secuencia de referencia. En algunas formas de realización, donde se pueda usar más de un aminoácido en una posición de un residuo específica de un polipéptido, los diversos residuos aminoácidos que se pueden usar están separados por "/" (por ejemplo, X192A/G). La presente invención incluye secuencias polipeptídicas modificadas que comprenden una o más diferencias de aminoácidos que incluyen sustituciones de aminoácidos ya sea conservativas o no conservativas, o tanto conservativas como no conservativas. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos cetorreductasa recombinantes específicos que se incluyen en el Listado de Secuencias de la presente invención incluyen un residuo metionina (M) inicial (es decir, M representa la

posición de residuo 1). Sin embargo, los expertos en la materia entienden que este residuo metionina inicial puede ser eliminado por la maquinaria de procesamiento biológico, por ejemplo en una célula huésped o en un sistema de traducción *in vitro*, para generar una proteína madura que carece del residuo metionina inicial, pero que conserva las propiedades de la enzima. Por lo tanto, el término "diferencia de residuos aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 2 en la posición Xn", tal como se lo usa en la presente, puede referirse a la posición "Xn" o a la posición correspondiente (por ejemplo, posición (X-1)n) en una secuencia de referencia que se ha procesado de manera que carece de la metionina inicial.

[0068] Tal como se la usa en la presente, la frase "sustituciones conservativas de aminoácidos" se refiere a que los residuos que tienen cadenas laterales similares son intercambiables y, por lo tanto, normalmente incluye la sustitución del aminoácido en el polipéptido por aminoácidos dentro de la misma clase definida de aminoácidos o de una clase similar. A manera de ejemplo y no como limitación, en algunas formas de realización, un aminoácido con una cadena lateral alifática se reemplaza por otro aminoácido alifático (por ejemplo, alanina, valina, leucina e isoleucina); un aminoácido con una cadena lateral hidroxilo se reemplaza por otro aminoácido con una cadena lateral hidroxilo (por ejemplo, serina y treonina); un aminoácido que tiene una cadena lateral aromática se reemplaza por otro aminoácido que tiene una cadena lateral aromática (por ejemplo, fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina); un aminoácido con una cadena lateral básica se reemplaza por otro aminoácido con una cadena lateral básica (por ejemplo, lisina y arginina); un aminoácido con una cadena lateral ácida se reemplaza por otro aminoácido con una cadena lateral ácida (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico); y/o un aminoácido hidrofóbico o hidrofílico se reemplaza por otro aminoácido hidrofóbico o hidrofílico, respectivamente. En la Tabla 1 se proveen ejemplos de sustituciones conservativas.

Tabla 1. Algunos ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos	
Residuo	Posibles sustituciones conservativas
A, L, V, I	Otros alifáticos (A, L, V, I) Otros no polares (A, L, V, I, G, M)
G, M	Otros no polares (A, L, V, I, G, M)
D, E	Otros ácidos (D, E)

K, R	Otros básicos (K, R)
N, Q, S, T	Otros polares
H, Y, W, F	Otros aromáticos (H, Y, W, F)
C, P	No polares

[0069] Tal como se la usa en la presente, la frase "sustitución no conservativa" se refiere a la sustitución de un aminoácido en el polipéptido por un aminoácido con propiedades de cadena lateral significativamente diferentes. En las sustituciones no conservativas se pueden usar aminoácidos *entre* los grupos definidos, en lugar de *dentro* de ellos, y afectan a (a) la estructura del esqueleto principal peptídico en el área de la sustitución (por ejemplo, prolina por glicina) (b) la carga o el carácter hidrofóbico, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. A manera de ejemplo y no como limitación, un ejemplo de sustitución no conservativa puede ser un aminoácido ácido sustituido (reemplazado) por un aminoácido básico o alifático; un aminoácido aromático sustituido por un aminoácido pequeño; y un aminoácido hidrofílico sustituido por un aminoácido hidrofóbico.

[0070] Como apreciarán los expertos en la técnica, a no ser que se especifique otra cosa algunas de las categorías definidas anteriormente no son mutuamente excluyentes. Por lo tanto, los aminoácidos que tienen cadenas laterales que exhiben dos o más propiedades fisicoquímicas se pueden incluir en múltiples categorías. La clasificación apropiada de cualquier aminoácido o residuo será evidente para los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la invención detallada que se provee en la presente.

[0071] Tal como se usa en la presente, "supresión" se refiere a la modificación del polipéptido mediante la eliminación de uno o más aminoácidos respecto 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 el polipéptido a la vez que se conserva la actividad enzimática y/o se conservan las propiedades mejoradas de una enzima modificada. Las supresiones se pueden dirigir hacia las porciones internas y/o hacia las porciones terminales del polipéptido. En diversas formas de realización, la supresión puede comprender un segmento continuo o puede ser discontinua.

[0072] Tal como se usa en la presente, "inserción" se refiere a la modificación del polipéptido mediante la adición de uno o más aminoácidos al polipéptido de referencia. En algunas

formas de realización, las enzimas cetorreductasa modificadas mejoradas comprenden inserciones de uno o más aminoácidos respecto del polipéptido cetorreductasa natural así como inserciones de uno o más aminoácidos en polipéptidos cetorreductasa modificados. Las inserciones pueden estar en las porciones internas del polipéptido, o en los extremos carboxi o amino. Tal como se usa aquí dicho término, las inserciones incluyen a las proteínas de fusión conocidas en el arte. La inserción puede ser un segmento contiguo de aminoácidos o puede estar separada por uno o más de los aminoácidos en el polipéptido natural.

[0073] Las expresiones "conjunto de sustitución de aminoácidos" o "conjunto de sustitución" se refiere a un grupo de sustituciones de aminoácidos en una secuencia polipeptídica, en comparación con una secuencia de referencia. Un conjunto de sustitución puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más sustituciones de aminoácidos. En algunas formas de realización, un conjunto de sustitución se refiere al conjunto de sustituciones de aminoácidos que está presente en cualquiera de las variantes de KRED que se mencionan en las Tablas que se proveen en los Ejemplos.

[0074] Tal como se lo usa en la presente, "fragmento" se refiere a un polipéptido que tiene una supresión amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia. Normalmente los fragmentos pueden tener aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % del polipéptido cetorreductasa de longitud completa, por ejemplo, del polipéptido de la SEQ ID NO: 4. En algunas formas de realización, el fragmento es "biológicamente activo" (es decir, exhibe la misma actividad enzimática que la secuencia de longitud completa).

[0075] Tal como se lo usa en la presente, "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 a los polipéptidos que se han extraído o purificado de su ambiente natural o sistema de expresión (por ejemplo, célula huésped o síntesis *in vitro*). Las enzimas cetorreductasa mejoradas pueden estar presentes dentro de una célula, pueden estar presentes en el medio celular o se pueden preparar en diversas formas, tales como lisados o preparaciones aisladas. Por lo tanto, en algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados de la presente invención pueden ser un polipéptido aislado.

[0076] Tal como se lo usa en la presente, "polipéptido sustancialmente puro" se refiere a una composición en la que la especie polipeptídica es la especie predominante presente (es decir,

en términos molares o en peso es más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual de la composición), y por lo general es una composición sustancialmente purificada cuando la especie objeto comprende por lo menos aproximadamente el 50 por ciento de la especie macromolecular presente por mol o como % en peso. Por lo general, una composición polipeptídica de cetorreductasa modificada sustancialmente pura comprenderá aproximadamente 60 % o más, aproximadamente 70 % o más, aproximadamente 80 % o más, aproximadamente 90 % o más, aproximadamente 91 % o más, aproximadamente 92 % o más, aproximadamente 93 % o más, aproximadamente 94 % o más, aproximadamente 95 % o más, aproximadamente 96 % o más, aproximadamente 97 % o más, aproximadamente 98 % o más, o aproximadamente 99 % de todas las especies macromoleculares por mol o como % en peso presentes en la composición. Las especies de solventes, las moléculas pequeñas (<500 Dalton) y las especies de iones elementales no se consideran especies macromoleculares. En algunas formas de realización, el polipéptido cetorreductasa mejorado aislado es una composición polipeptídica sustancialmente pura.

[0077] Tal como se lo usa en la presente, cuando se usa con referencia a un ácido nucleico o polipéptido, el término "heterólogo" se refiere a una secuencia que normalmente no es expresada ni secretada por un organismo (por ejemplo, un organismo de tipo salvaje). En algunas formas de realización, el término abarca una secuencia que comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí con que normalmente se encuentran en la naturaleza, o se ha modificado de manera recombinante para que su nivel de expresión o relación física con otros ácidos nucleicos u otras moléculas en una célula, o estructura, no sea el que normalmente se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo se produce normalmente de manera recombinante, con dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestas de una manera que no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, un marco de lectura abierto (ORF) de ácido nucleico de la invención conectado operativamente a una secuencia promotora insertada en un casete de expresión, tal como un vector). En algunas formas de realización, "polinucleótido heterólogo" se refiere a cualquier polinucleótido que se introduce en una célula huésped mediante técnicas de laboratorio e incluye a los polinucleótidos que son extraídos de una célula huésped, sometidos a una manipulación de laboratorio y luego son reintroducidos en una célula huésped.

[0078] Tal como se usa en la presente, "codón optimizado" se refiere a cambios en los codones del polinucleótido que codifica una proteína para obtener aquellos que se utilizan

preferentemente en un organismo en particular, de manera que la proteína codificada se exprese de manera eficiente en el organismo de interés. En algunas formas de realización, los polinucleótidos que codifican las enzimas cetorreductasa pueden tener codones optimizados para una producción óptima por el organismo huésped seleccionado para la expresión.

[0079] Tal como se usa en la presente, "secuencia de control" se define aquí de manera que incluye a todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido y/o polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o ajena al polinucleótido de interés. Dichas secuencias de control incluyen, pero de manera no taxativa, a: una secuencia directriz, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, una secuencia promotora, una secuencia de péptido señal y una secuencia terminador de la transcripción.

[0080] Tal como se usa en la presente, "conectado operativamente" se define aquí como una configuración en la que una secuencia de control se coloca adecuadamente (es decir, en una relación funcional) en una posición relativa a un polinucleótido de interés de tal manera que la secuencia de control dirige o regula la expresión del polinucleótido y/o polipéptido de interés.

[0081] Tal como se las usa en la presente, las expresiones "sistema de regeneración de cofactores" y "sistema de reciclaje de cofactores" se refieren a un conjunto de reactivos que participan en una reacción que reduce la forma oxidada del cofactor (por ejemplo, NADP⁺ a NADPH). El sistema de regeneración de cofactores regenera a la forma reducida a los cofactores oxidados por la reducción del sustrato cetónico catalizada por cetorreductasa. Los sistemas de regeneración de cofactores comprenden un reductor estequiométrico que es una fuente de equivalentes de hidrógeno reductor y es capaz de reducir la forma oxidada del cofactor. El sistema de regeneración de cofactores puede comprender además un catalizador, por ejemplo, un catalizador enzimático que cataliza la reducción de la forma oxidada del cofactor por el reductor. Los sistemas de regeneración de cofactores para regenerar NADH o NADPH a partir de NAD⁺ o NADP⁺, respectivamente, son conocidos en el arte y se pueden usar en los métodos que se describen en la presente.

[0082] Tal como se usa en la presente, "condiciones de reacción adecuadas" se refiere a aquellas condiciones en la solución de reacción biocatalítica (por ejemplo, rangos de carga de enzima, carga de sustrato, carga de cofactor, temperatura, pH, reguladores de pH, cosolventes, etc.) en las cuales los polipéptidos cetorreductasa de la presente invención son capaces de reducir estereoselectivamente un compuesto sustrato a un compuesto producto. En

la presente invención se proveen ejemplos de "condiciones de reacción adecuadas" y se ilustran mediante los ejemplos.

[0083] Tal como se usa en la presente, "carga", como en "carga de compuestos", "carga de enzimas" o "carga de cofactores" se refiere a la concentración o cantidad de un componente en una mezcla de reacción al comienzo de la reacción.

[0084] Tal como se usa en la presente, en el contexto de un proceso mediado por un biocatalizador, "sustrato" se refiere al compuesto o molécula sobre la que actúa el biocatalizador. Por ejemplo, un ejemplo de sustrato para el biocatalizador cetorreductasa en el proceso que se describe en la presente es un iso- α -ácido.

[0085] Tal como se usa en la presente, en el contexto de un proceso mediado por un biocatalizador, "producto" se refiere al compuesto o molécula que se obtiene como resultado de la acción del biocatalizador.

[0086] Tal como se usa en la presente, "equilibrio" se refiere al proceso que da como resultado una concentración en estado estacionario de especies químicas en una reacción química o enzimática (por ejemplo, interconversión de dos especies A y B), incluyendo a la interconversión de estereoisómeros, determinada por la constante de velocidad directa y la constante de velocidad inversa de la reacción química o enzimática.

[0087] Tal como se usa en la presente, "oxo" se refiere a $=O$.

[0088] Tal como se usa en la presente, "oxi" se refiere a un grupo divalente $-O-$, que puede tener diversos sustituyentes para formar diferentes grupos oxi, incluyendo a éteres y ésteres.

[0089] Tal como se usa en la presente, "carboxi" se refiere a $-COOH$.

[0090] Tal como se usa en la presente, "carbonilo" se refiere a $-C(O)-$, que puede tener una variedad de sustituyentes para formar diferentes grupos carbonilo, que incluyen ácidos, haluros de ácido, aldehídos, amidas, ésteres y cetonas.

[0091] Tal como se usa en la presente, "hidroxi" se refiere a $-OH$.

[0092] Tal como se usa en la presente, "opcional" y "opcionalmente" significan que puede ser que el evento o circunstancia que se describe posteriormente ocurra o no, y que la descripción incluye instancias en las que ocurre el evento o circunstancia e instancias en las que no ocurre. Alguien con una experiencia normal en la técnica comprenderá que, usado con respecto a cualquier molécula descrita que contenga uno o más sustituyentes opcionales, la intención solo es incluir a los compuestos estéricamente prácticos y/o que se puedan obtener por síntesis.

[0093] Tal como se usa en la presente, "opcionalmente sustituido" se refiere a todos los modificadores previos en un término o serie de grupos químicos. Por ejemplo, en el término "arilalquilo opcionalmente sustituido", la porción "alquilo" y la porción "arilo" de la molécula pueden estar o no sustituidas, y para la serie "alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos", los grupos alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo, independientemente de los demás, pueden estar sustituidos o no.

Polipéptidos enzimáticos modificados

[0094] Los biocatalizadores de cetereductasa (KRED) o carbonil reductasa (EC 1.1.184) son útiles para la síntesis de alcoholes a partir de aldehídos y cetonas, y de alcoholes secundarios con actividad óptica a partir de los correspondientes sustratos de cetonas proestereoisoméricas. Los KRED también pueden catalizar la reacción inversa (es decir, la oxidación de un sustrato de alcohol al correspondiente producto de aldehídos/cetonas). En la reducción de aldehídos y cetonas y la oxidación de alcoholes por la KRED se utiliza un cofactor, más comúnmente dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) o dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido (NADPH), y dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (NADP⁺) para la reacción de oxidación. NADH y NADPH sirven como donantes de electrones, mientras que NAD⁺ y NADP⁺ sirven como aceptores de electrones.

[0095] Los KRED se pueden encontrar en una amplia variedad de bacterias y levaduras, como es sabido en este campo (véase, por ejemplo, Hummel y Kula *Eur. J. Biochem.*, 184:1-13 [1989]). Se han informado numerosos genes de KRED y secuencias de la enzima, incluyendo a aquellos de *Candida magnoliae* (Nº de acceso de Genbank JC7338; GI: 11360538); *Candida parapsilosis* (Nº de acceso de Genbank BAA24528,1; GI: 2815409), *Sporobolomyces salmonicolor* (Nº de acceso de Genbank AF160799; GI: 6539734), *Lactobacillus kefir* (Nº de acceso de Genbank AAP94029,1; GI: 33112056), *Lactobacillus brevis* (Nº de acceso de Genbank INXQ_A; GI: 30749782), y *Thermoanaerobium brockii* (Nº de acceso de Genbank P14941; GI: 1771790).

[0096] La estereoselectividad de las cetereductasas se ha aplicado a la preparación de importantes bloques de construcción farmacéuticos (véase, por ejemplo, Broussy y colaboradores, *Org. Lett.*, 11: 305-308 [2009]). Se han demostrado aplicaciones específicas de KRED naturales o modificadas en procesos biocatalíticos para generar compuestos químicos útiles para la reducción de ésteres de 4-cloroacetoacetato (véase, por ejemplo,

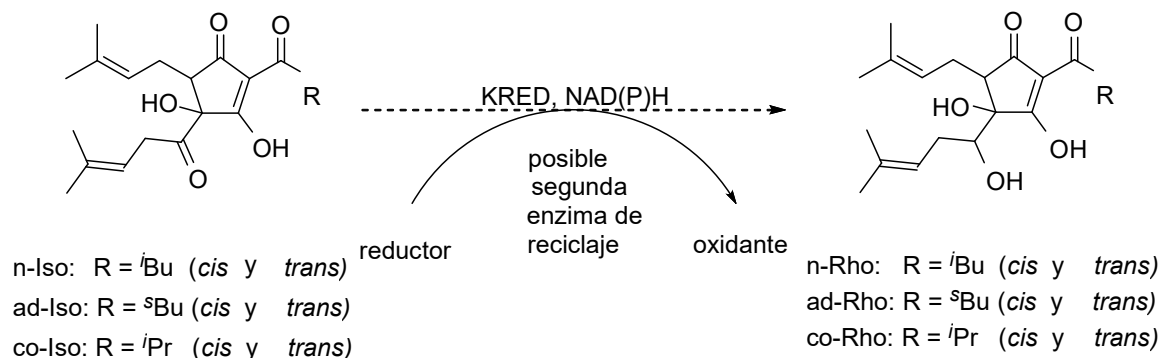
Zhou, *J. Am. Chem. Soc.*, 105: 5925-5926 [1983], Santaniello, *J. Chem. Res.*, (S) 132-133 [1984], Patente de EE.UU. N° 5.559.030, Patente de EE.UU. N° 5.700.670 y Patente de EE.UU. N° 5.891.685), reducción de ácidos dioxocarboxílicos (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. N° 6.399.339), reducción de (S)-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de *ter*-butilo (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. N° 6.645.746; y WO 01/40450), reducción de compuestos basados en pirrolotriazina (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de EE.UU. N° 2006/0286646); reducción de acetofenonas sustituidas (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 6.800.477 y 8.748.143); y reducción de cetotiolanos (WO 2005/054491).

[0097] Los iso- α -ácidos ("iso") existen como una mezcla compleja de epímeros *cis* y *trans*. En total, hay tres cadenas laterales diferentes ("R" en iso), que comúnmente se denominan *n*-, *ad*- y *co*- (iBu, sBu e iPr respectivamente). Además, se espera que *ad*-iso (R= s-Bu) exista como un par de enantiómeros. Cada uno de los *n*-, *ad*- y *co*-iso también se presenta como un par isomérico *cis/trans* correspondiente, así como potencialmente un par enantiomérico derivado del alcohol terciario C4 adyacente a la cetona a reducir. En total, sin tener en cuenta los tautómeros del núcleo de ácido tetrónico, hay hasta 16 isómeros de iso- α -ácidos (4 R, *cis/trans* y enantiómero).

[0098] Las enzimas suelen ser extremadamente selectivas con respecto al sustrato sobre el que actúan. Por lo tanto, es inesperado que una sola enzima o incluso una simple mezcla de dos enzimas pueda convertir completamente los 16 isómeros de los iso- α -ácidos en los correspondientes dihidro-(rho)-iso- α -ácidos. Sorprendentemente, la presente invención comprende un proceso para convertir iso- α -ácidos en dihidro-(rho)-iso- α -ácidos usando una mezcla simple de enzima(s) y cofactor. Además, la biotransformación mediante enzimas (KRED) permite que la elaboración de dihidro-(rho)-iso- α -ácidos a partir de iso- α -ácidos se pueda etiquetar/certificar como "natural".

[0099] La presente invención provee cetorreductasas modificadas capaces de reducir indiscriminadamente los 16 isómeros principales de los iso- α -ácidos a los correspondientes dihidro-(rho)-iso- α -ácidos reduciendo regioselectivamente solo la cetona presente en la cadena lateral isoprenilo adyacente al alcohol terciario, según se muestra en el Esquema 1.

Esquema 1



[0100] El polipéptido cetorreductasa de la SEQ ID NO: 4 se seleccionó como la cadena principal inicial para el desarrollo de las enzimas mejoradas provistas por la presente invención. La enzima de la SEQ ID NO: 4 se obtiene de la cetorreductasa de tipo salvaje de *Lactobacillus kefir* (SEQ ID NO: 2). el polipéptido de la SEQ ID NO: 4 se seleccionó como el cadena de partida debido a su alta actividad en la conversión de iso- α -ácidos en los correspondientes dihidro-(rho)-iso- α -ácidos, así como a su relativa promiscuidad y capacidad de convertir una variedad de isómeros y epímeros de isohumulona en los correspondientes productos dihidro-(rho)-iso- α -ácido. Además, el polipéptido de la SEQ ID NO: 4 mostró actividad en una variedad de condiciones de reacción. Se encontró que la secuencia de tipo salvaje de la SEQ ID NO: 2 no tenía actividad detectable sobre la conversión de iso- α -ácidos en los correspondientes dihidro-(rho)-iso- α -ácidos.

[0101] Los polipéptidos cetorreductasa modificados de la presente invención son cetorreductasas modificadas para presentar propiedades mejoradas en comparación con la cetorreductasa modificada de la SEQ ID NO: 4. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados de la presente invención tienen una actividad mejorada de conversión de iso- α -ácidos en los correspondientes dihidro-(rho)-iso- α -ácidos en comparación con el polipéptido modificado de la SEQ ID NO: 4. En algunas otras formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados de la presente invención tienen actividad mejorada sobre un rango de sustratos de iso- α -ácidos, en comparación con el

polipéptido modificado de la SEQ ID NO: 4. En algunas otras formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados de la presente invención tienen actividad mejorada sobre un rango de concentraciones de sustrato y cofactor, en comparación con el polipéptido modificado de la SEQ ID NO: 4. En algunas otras formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados de la presente invención tienen una actividad mejorada a altas concentraciones de sustrato, en comparación con el polipéptido modificado de la SEQ ID NO: 4. En algunas otras formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados de la presente invención tienen una actividad mejorada a bajas concentraciones de cofactor, en comparación con el polipéptido modificado de la SEQ ID N°: 4.

[0102] En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados tienen actividad mejorada sobre uno o más sustratos. En algunas formas de realización, el sustrato comprende una mezcla de iso- α -ácidos. En algunas formas de realización, el sustrato comprende cis-isohumulona. En algunas formas de realización, el sustrato comprende trans-isohumulona. En algunas formas de realización, el sustrato comprende cis-isocohumulona. En algunas formas de realización, el sustrato comprende trans-isocohumulona. En algunas formas de realización, el sustrato comprende cis-isoadhumulona. En algunas formas de realización, el sustrato comprende trans-isoadhumulona.

[0103] En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados tienen actividad mejorada sobre uno o más sustratos. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados tienen actividad mejorada sobre una mezcla de iso- α -ácidos. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados tienen actividad mejorada sobre la cis-isohumulona. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados tienen actividad mejorada sobre la trans-isohumulona. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados tienen actividad mejorada sobre la cis-isocohumulona. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados tienen actividad mejorada sobre la trans-isocohumulona. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados tienen actividad mejorada sobre la cis-isoadhumulona. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados tienen una actividad mejorada sobre la trans-isoadhumulona.

[0104] En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados convierten compuestos del sustrato en compuestos producto en presencia de un sistema de reciclaje de cofactores. En algunas formas de realización, el sistema de reciclaje de cofactores

comprende una segunda enzima, como la glucosa deshidrogenasa. En algunas formas de realización, el sistema de reciclaje de cofactores comprende isopropanol.

[0105] En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados son capaces de convertir los compuestos del sustrato en compuestos producto con una actividad que aumenta por lo menos aproximadamente 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o 100 veces con relación a la actividad de los polipéptidos de referencia de las SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328, y/o 330 en las condiciones de reacción adecuadas. En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa modificados son capaces de convertir los compuestos del sustrato en compuestos producto con un porcentaje de conversión de por lo menos aproximadamente 40 %, por lo menos aproximadamente 50 %, por lo menos aproximadamente 60 %, por lo menos aproximadamente 70 %, por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99%, en un tiempo de reacción de aproximadamente 48 h, aproximadamente 36 h, aproximadamente 24 h, o incluso en un tiempo más corto, en las condiciones de reacción adecuadas.

[0106] Las condiciones de reacción adecuadas pueden comprender una combinación de parámetros de reacción que provean la conversión biocatalítica de los compuestos del sustrato en los correspondientes compuestos producto. Por lo tanto, en algunas formas de realización del proceso, la combinación de parámetros de reacción comprende: (a) entre aproximadamente 0,1 y 220 g/l de compuesto(s) del sustrato; (b) entre aproximadamente 0,5 y 50 g/l de polipéptido modificado; (c) entre aproximadamente 0,01 y 10 g/l de NADP⁺ en isopropanol aproximadamente 10-60% (d) trietanolamina*H₂SO₄ entre aproximadamente 5 y 200 mM; (e) MgSO₄ o MgCl₂ entre aproximadamente 0 y 5 mM; (f) temperatura de entre aproximadamente 25 °C y 60 °C; y (g) pH entre 6 y 10. Por lo tanto, en algunas formas de realización del proceso, la combinación de parámetros de reacción comprende: (a) entre aproximadamente de 10 y 220 g/l de compuesto(s) del sustrato; (b) entre aproximadamente 0,5 y 50 g/l de polipéptido modificado; (c) entre aproximadamente 0,01 y 10 g/l de NADP⁺ en isopropanol aproximadamente 10-60% (d) fosfato de sodio o potasio entre aproximadamente 5 y 200 mM; (e) MgSO₄ o MgCl₂ entre aproximadamente 0 y 5 mM; (f) temperatura de entre aproximadamente 25 °C y 60 °C; y (g) pH entre aproximadamente 6 y 10.

[0107] En algunas formas de realización, la combinación de parámetros de reacción comprende: (a) aproximadamente 80 g/l de compuesto sustrato, (b) aproximadamente 20 g/l de polipéptido modificado; (c) aproximadamente 0,01 g/l de NADP⁺ en isopropanol al 40%; (d) trietanolamina*H₂SO₄ aproximadamente 100 mM; (e) MgSO₄ aproximadamente 2 mM, (f) aproximadamente 40 °C; y (g) pH de aproximadamente 8. En algunas formas de realización, la combinación de parámetros de reacción comprende: (a) aproximadamente 160 g/l de compuestos sustrato; (b) aproximadamente 20 g/l de polipéptido modificado; (c) aproximadamente 0,01 g/l de NADP⁺ en isopropanol al 40%; (d) fosfato de potasio aproximadamente 100 mM; (e) MgSO₄ aproximadamente 2 mM, (f) aproximadamente 40 °C; y (g) pH de aproximadamente 8.

[0108] Los ejemplos adicionales de condiciones de reacción incluyen las condiciones de ensayo que se proveen en los Ejemplos.

[0109] En algunas formas de realización, las enzimas cetorreductasa modificadas mejoradas comprenden supresiones de residuos aminoácidos en los polipéptidos cetorreductasa naturales o supresiones de residuos aminoácidos en otros polipéptidos cetorreductasa modificados. De esa manera, en algunas formas de realización de la invención, las supresiones comprenden uno o más aminoácidos, 2 o más aminoácidos, 3 o más aminoácidos, 4 o más aminoácidos, 5 o más aminoácidos, 6 o más aminoácidos, 8 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos, o 20 o más aminoácidos, hasta el 10 % del número total de aminoácidos, hasta 20 % del número total de aminoácidos, o hasta el 30% del número total de aminoácidos de los polipéptidos cetorreductasa, con la condición de que se conserve la actividad funcional de la cetorreductasa. En algunas formas de realización, las supresiones pueden comprender, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-14, 1-15, 1-16, 1-18, 1-20, 1-22, 1-24, 1-25, 1-30, 1-35 o aproximadamente 1-40 residuos aminoácidos. En algunas formas de realización, el número de supresiones puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 35 o aproximadamente 40 aminoácidos. En algunas formas de realización, las supresiones pueden comprender supresiones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, o 20 residuos aminoácidos.

[0110] Tal como se describe en la presente, los polipéptidos cetorreductasa de la invención pueden estar en forma de polipéptidos de fusión en los cuales las cetorreductasas están fusionadas con otros polipéptidos, tales como marcas de anticuerpos (por ejemplo, el epitope myc) o secuencias de purificación (por ejemplo, marcas His). Por lo tanto, en algunas formas

de realización, los polipéptidos cetorreductasa se utilizan fusionados con otros polipéptidos o sin fusionar.

[0111] En algunas formas de realización, los polipéptidos que se describen en la presente no están restringidos a los aminoácidos codificados genéticamente. Además de los aminoácidos codificados genéticamente, los polipéptidos que se describen en la presente pueden comprender, en toda su extensión o en parte, aminoácidos naturales y/o sintéticos no codificados. Ciertos aminoácidos no codificados que se encuentran comúnmente que pueden comprender los polipéptidos que se describen en la presente incluyen, pero de manera no taxativa, a: los estereoisómeros D de los aminoácidos codificados genéticamente; ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr); ácido α -aminoisobutírico (Aib); ácido ε -aminohexanoico (Aha); ácido δ -aminovalérico (Ava); N-metilglicina o sarcosina (MeGly o Sar); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (Bua); t-butilglicina (Bug); N-metilisoleucina (MeIle); fenilglicina (Phg); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle); naftilalanina (Nal); 2-clorofenilalanina (Ocf); 3-clorofenilalanina (Mcf); 4-clorofenilalanina (Pcf); 2-fluorofenilalanina (Off); 3-fluorofenilalanina (Mff); 4-fluorofenilalanina (Pff); 2-bromofenilalanina (Obf); 3-bromofenilalanina (Mbf); 4-bromofenilalanina (Pbf); 2-metilfenilalanina (Omf); 3-metilfenilalanina (Mmf); 4-metilfenilalanina (Pmf); 2-nitrofenilalanina (Onf); 3-nitrofenilalanina (Mnf); 4-nitrofenilalanina (Pnf); 2-cianofenilalanina (Ocf); 3-cianofenilalanina (Mcf); 4-cianofenilalanina (Pcf); 2-trifluorometilfenilalanina (Otf); 3-trifluorometilfenilalanina (Mtf); 4-trifluorometilfenilalanina (Ptf); 4-aminofenilalanina (Paf); 4-yodofenilalanina (Pif); 4-aminometilfenilalanina (Pamf); 2,4-diclorofenilalanina (Opef); 3,4-diclorofenilalanina (Mpcf); 2,4-difluorofenilalanina (Opff); 3,4-difluorofenilalanina (Mpff); pirid-2-ilalanina (2pAla); pirid-3-ilalanina (3pAla); pirid-4-ilalanina (4pAla); naft-1-ilalanina (1nAla); naft-2-ilalanina (2nAla); tiazolilalanina (taAla); benzotienilalanina (bAla); tienilalanina (tAla); furilalanina (fAla); homofenilalanina (hPhe); homotirosina (hTyr); homotriptófano (hTrp); pentafluorofenilalanina (5ff); estirilalanina (sAla); antrilalanina (aAla); 3,3-difenilalanina (Dfa); ácido 3-amino-5-fenilpentanoico (Afp); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (Tic); β -2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (Mso); N(ω)-nitroarginina (nArg); homolisina (hLys); fosfometilfenilalanina (pmPhe); fosfoserina (pSer); fosfotreonina (pThr); ácido homoaspártico (hAsp); ácido homoglutánico (hGlu); ácido 1-aminociclopent-(2 o 3)-eno-4 carboxílico; ácido pipercolico (PA), ácido azetidina-3-carboxílico (ACA); ácido 1-aminociclopentano-3-carboxílico; alilglicina (aOly);

propargilglicina (pgGly); homoalanina (hAla); norvalina (nVal); homoleucina (hLeu), homovalina (hVal); homoisoleucina (hIle); homoarginina (hArg); N acetil lisina (AcLys); ácido 2,4-diaminobutírico (Dbu); ácido 2,3-diaminobutírico (Dab); N-metilvalina (MeVal); homocisteína (hCys); homoserina (hSer); hidroxiprolina (Hyp) y homoprolina (hPro). Otros aminoácidos no codificados adicionales que los polipéptidos que se describen en la presente pueden comprender son evidentes para los expertos en la técnica. Estos aminoácidos pueden estar en la configuración ya sea L o D.

[0112] Los expertos en la técnica reconocerán que los polipéptidos que se describen en la presente también pueden comprender aminoácidos o residuos que llevan grupos protectores de cadenas laterales. Algunos ejemplos no limitantes de dichos aminoácidos protegidos, que en este caso pertenecen a la categoría aromática incluyen, pero de manera no taxativa, a (los grupos protectores se mencionan entre paréntesis): Arg(tos), Cys(metilbencilo), Cys (nitropiridinasulfenilo), Glu(éster δ -bencílico), Gln(xantilo), Asn(N- δ -xantilo), His(bom), His(bencilo), His(tos), Lys(fmoc), Lys(tos), Ser(O-bencilo), Thr (O-bencilo) y Tyr(O-bencilo).

[0113] Los aminoácidos no codificantes restringidos conformacionalmente con los cuales pueden estar compuestos los polipéptidos que se describen en la presente incluyen, pero de manera no taxativa, a: N-metil aminoácidos (configuración L); ácido 1-aminociclopent-(2 o 3)-eno-4-carboxílico; ácido piperídico; ácido azetidina-3-carboxílico; homoprolina (hPro); y ácido 1 aminociclopentano-3-carboxílico.

[0114] Como se describió anteriormente, las diversas modificaciones introducidas en el polipéptido de origen natural para generar una enzima cetorreductasa modificada pueden dirigirse hacia una propiedad específica de la enzima.

Polinucleótidos que codifican enzimas modificadas

[0115] En otro aspecto, la presente invención provee polinucleótidos que codifican la cetorreductasa modificada. Los polinucleótidos pueden estar conectados operativamente a una o más secuencias reguladoras heterólogas que controlan la expresión génica para crear un polinucleótido recombinante capaz de expresar el polipéptido. Las construcciones de expresión que contienen un polinucleótido heterólogo que codifica la cetorreductasa modificada se pueden introducir en células huésped apropiadas para expresar el correspondiente polipéptido cetorreductasa.

[0116] Debido al conocimiento de los codones correspondientes a los diversos aminoácidos, la disponibilidad de una secuencia de proteína provee una descripción de todos los polinucleótidos capaces de codificar el sujeto. La degeneración del código genético, donde los mismos aminoácidos están codificados por codones alternativos o sinónimos, permite producir un número extremadamente grande de ácidos nucleicos, todos los cuales codifican las enzimas cetorredutasa mejoradas que se describen en la presente. Por lo tanto, habiendo identificado una secuencia de aminoácidos en particular, los expertos en la técnica podrían producir cualquier cantidad de ácidos nucleicos diferentes simplemente modificando la secuencia de uno o más codones de manera que no cambie la secuencia de aminoácidos de la proteína. En este sentido, la presente invención contempla específicamente a todas y cada una de las posibles variaciones de polinucleótidos que se podrían hacer seleccionando combinaciones basadas en las posibles selecciones de codones, y se debe considerar que todo polipéptido divulgado en la presente abarca la divulgación específica de todas dichas variaciones, incluyendo a las secuencias de aminoácidos que se presentan en las Tablas de los Ejemplos. En diversas formas de realización, se seleccionan preferentemente los codones para adaptarlos a la célula huésped en la que se produce la proteína. Por ejemplo, para expresar el gen en bacterias se usan los codones preferidos que se utilizan en bacterias; para la expresión en levaduras se usan los codones preferidos que se utilizan en levadura; y para la expresión en células de mamífero se usan los codones preferidos que se utilizan en mamíferos.

[0117] En algunas formas de realización, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido cetorredutasa de origen natural, representada por la SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, el polinucleótido tiene una secuencia de ácidos nucleicos que comprende por lo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con las secuencias de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, 5, 79, 103, 171, 185, 193, 251, 269, 271, 285, 327 y/o 329, cada uno de los cuales codifica las secuencias polipeptídicas idénticas de las SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328, y/o 330, respectivamente.

[0118] En algunas formas de realización, el polinucleótido codifica un polipéptido enzimático modificado que tiene actividad enzimática con las propiedades que se describen en la presente, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia de referencia que se selecciona entre las SEQ ID NO que se proveen en la presente, o la secuencia de aminoácidos de cualquier variante (por ejemplo, las que se proveen en los Ejemplos), y una o más diferencias de residuos en comparación con los polinucleótidos de referencia, o la secuencia de aminoácidos de cualquier variante según se describe en los Ejemplos (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más posiciones de residuos aminoácidos). En algunas formas de realización, la secuencia polipeptídica de referencia se selecciona entre las SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328, y/o 330.

[0119] En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica la cetorreductasa modificada comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene por lo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia que se selecciona entre las SEQ ID NO: 3, 5, 79, 103, 171, 185, 193, 251, 269, 271, 285, 327 y/o 329. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica la cetorreductasa modificada comprende a las SEQ ID NO: 5, 79, 103, 171, 185, 193, 251, 269, 271, 285, 327 y/o 329. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica la cetorreductasa modificada comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene por lo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia que se selecciona entre las SEQ ID NO: 5 a 411. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica la cetorreductasa modificada comprende una secuencia de polinucleótidos que se selecciona entre las SEQ ID NO: 5 a 411.

[0120] En algunas formas de realización, las secuencias de cetorreductasa modificadas comprenden secuencias que comprenden posiciones que se han identificado como beneficiosas, según se describe en los Ejemplos.

[0121] En algunas formas de realización, los polinucleótidos aislados que codifican una cetorreductasa mejorada se manipulan en una variedad de maneras para proveer una expresión y/o producción de los polipéptidos mejoradas. Dependiendo del vector de expresión que se utilice puede ser deseable o necesaria la manipulación del polinucleótido aislado antes de insertarlo en un vector. Las técnicas para modificar polinucleótidos y secuencias de ácidos nucleicos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en el arte.

[0122] Para las células huésped bacterianas, los promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención incluyen a

los promotores que se obtienen del operón lac de *E. coli*, el gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA), el gen de levansacarasa de *Bacillus subtilis* (sacB), gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), el gen de la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), gen de la alfa-amilasa del *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), el gen de la penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, y el gen de beta-lactamasa procariótica (véase, por ejemplo, Villa-Kamaroff y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3727-3731 [1978]), así como el promotor tac (véase, por ejemplo, DeBoer y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25 [1983]). Los expertos en la técnica conocen otros promotores adecuados adicionales.

[0123] Para las células huésped de hongos filamentosos, los promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención incluyen promotores que se obtienen de los genes de la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, de la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, de la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, de la alfa-amilasa estable en ácidos de *Aspergillus niger*, de la glucoamilasa (glaA) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, de la lipasa de *Rhizomucor miehei*, de la proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, de la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, de la acetamidasa de *Aspergillus nidulans* y de la proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum* (documento WO 96/00787), así como el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes de la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*), y sus promotores mutantes, truncados e híbridos.

[0124] En un huésped de levadura, los promotores útiles incluyen, de manera no taxativa, a: aquellos de los genes de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), de la galactoquinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), de la alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP), y de la 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, así como otros promotores útiles para células huésped de levaduras (véase, por ejemplo, Romanos y colaboradores, *Yeast* 8:423-488 [1992]).

[0125] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia que la célula huésped reconoce para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está conectada operativamente al extremo 3' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. En la presente invención se puede usar cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped que se seleccione.

[0126] Por ejemplo, se pueden obtener ejemplos de terminadores de transcripción para células huésped de hongos filamentosos a partir de los genes de la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y la proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0127] Se pueden obtener ejemplos de terminadores para células huésped de levadura a partir de los genes para la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*, así como otros terminadores útiles para células huésped de levadura conocidas en el arte (véase, por ejemplo, Romanos y colaboradores, citado anteriormente).

[0128] La secuencia de control también puede ser una secuencia directriz adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por parte de la célula huésped. La secuencia directriz está unida operativamente al extremo 5' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. Se puede usar cualquier secuencia de directriz que sea funcional en la célula huésped que se seleccione. Algunos ejemplos de directrices para células huésped de hongos filamentosos se pueden obtener a partir de los genes de la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae* y la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*. Se pueden obtener directrices adecuadas para las células huésped de levadura de los genes para la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), la 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

[0129] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia conectada operativamente al extremo 3' de la secuencia de ácidos nucleicos y que, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para agregar residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. En la presente invención se puede usar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped que se seleccione. Algunos ejemplos de secuencias de poliadenilación para células huésped de hongos filamentosos pueden ser de los genes de la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum* y la alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, así como otras secuencias de poliadenilación adicionales útiles para células huésped de levadura

conocidas en el arte (véase, por ejemplo, Guo y colaboradores, *Mol. Cell. Biol.*, 15:5983-5990 [1995]).

[0130] La secuencia de control también puede ser una región codificante de un péptido señal que codifica una secuencia de aminoácidos unida al extremo amino de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado hacia la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de ácidos nucleicos puede contener inherentemente una región de codificación de péptido señal conectada de manera natural en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región de codificación que codifica el polipéptido secretado. De manera alternativa, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal que es ajena a la secuencia codificante. La región codificante del péptido señal extraño puede ser necesaria cuando la secuencia codificante no contiene naturalmente una región codificante del péptido señal.

[0131] De manera alternativa, la región codificante del péptido señal extraño puede simplemente reemplazar la región codificante del péptido señal natural para aumentar la secreción del polipéptido. Sin embargo, en la presente invención se puede utilizar cualquier región codificante de péptido señal que dirija al polipéptido expresado hacia la vía secretora de una célula huésped que se seleccione.

[0132] Las regiones codificantes de péptidos señal eficaces para células huésped bacterianas son las regiones codificantes de péptidos señal que se obtienen de los genes de la amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, betalactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) y *Bacillus subtilis* prsA, así como péptidos señal adicionales conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Simonen y colaboradores, *Microbiol. Rev.*, 57: 109-137 [1993]).

[0133] Las regiones codificantes de péptido señal efectivas para células huésped de hongos filamentosos incluyen, pero de manera no taxativa, a: las regiones codificantes de péptido señal que se obtienen de los genes de la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens* y lipasa de *Humicola lanuginosa*. Los péptidos señal útiles para las células huésped de levadura pueden ser de los genes del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*, así como regiones codificantes de péptido señal útiles adicionales (véase, por ejemplo, Romanos y colaboradores, 1992, citado anteriormente).

[0134] La secuencia de control también puede ser una región codificante de propéptido que codifica una secuencia de aminoácidos situada en el extremo amino de un polipéptido. El polipéptido que se obtiene como resultado se denomina proenzima o propolipéptido (o en algunos casos zimógeno). Por lo general, un propolipéptido es inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo maduro mediante escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La región codificante del propéptido se puede obtener de los genes de la proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), la proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y la lactasa de *Myceliophthora thermophila* (documento WO 95/33836).

[0135] Cuando las regiones tanto del péptido señal como del propéptido están presentes en el extremo amino de un polipéptido, la región del propéptido se ubica junto al extremo amino de un polipéptido y la región del péptido señal se sitúa junto al extremo amino de la región del propéptido.

[0136] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido con relación al crecimiento de la célula huésped. Algunos ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que activan o desactivan la expresión del gen en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. En las células huésped procarióticas, las secuencias reguladoras adecuadas incluyen a los sistemas operadores lac, tac y trp. En las células huésped de levadura, los sistemas reguladores adecuados incluyen, como ejemplos, al sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, las secuencias reguladoras adecuadas incluyen al promotor de alfa-amilasa TAKA, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*.

[0137] Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En los sistemas eucarióticos, estos incluyen al gen de la dihidrofolato reductasa, que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína, que son amplificados por metales pesados. En estos casos, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido KRED de la presente invención estaría conectada operativamente con la secuencia reguladora.

[0138] Por lo tanto, en algunas formas de realización, la presente invención se refiere a también un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido cetorreductasa modificado o una variante del mismo, y una o más regiones reguladoras de la expresión, tal como un promotor y un terminador, un origen de replicación,

etc., dependiendo del tipo de huéspedes en los que se vayan a introducir. Las diversas secuencias de ácidos nucleicos y de control descritas anteriormente se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido en dichos sitios. De manera alternativa, la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención se puede expresar insertando en un vector apropiado para la expresión la secuencia de ácidos nucleicos o una construcción de ácidos nucleicos que comprende la secuencia. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se sitúa en el vector de manera que la secuencia codificante quede conectada operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0139] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus), que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y con el que pueda obtenerse la expresión de la secuencia de polinucleótidos. Típicamente, la selección del vector dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se va a introducir dicho vector. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

[0140] El vector de expresión puede ser un vector de replicación autónoma (es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica), cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica (por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial). El vector puede contener cualquier medio que asegure la autorreplicación. De manera alternativa, el vector puede ser tal que, al ser introducido en la célula huésped se integra en el genoma y se replica junto con el o los cromosomas en los que se ha integrado. Además, se pueden usar un solo vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contengan el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

[0141] El vector de expresión de la presente invención contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables, que permiten una fácil selección de las células transformadas. Un marcador seleccionable puede ser un gen cuyo producto provee resistencia a un biocida o virus, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y otras características similares. Algunos ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Los marcadores

adecuados para las células huésped de levaduras son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3.

[0142] Los marcadores seleccionables para usar en células huésped de hongos filamentosos incluyen, de manera no taxativa, a: amdS (acetamidasa), argB (ornitina carbamoiltransferasa), bar (fosfinotricina acetiltransferasa), hph (higromicina fosfotransferasa), niaD (nitrato reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), sC (sulfato adeniltransferasa) y trpC (antranilato sintasa), así como sus equivalentes. Las formas de realización para usar en una célula de *Aspergillus* incluyen a los genes amdS y pyrG de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y al gen bar de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0143] Los vectores de expresión de la presente invención pueden contener uno o más elementos que permiten la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independientemente del genoma. Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración del vector en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga.

[0144] De manera alternativa, el vector de expresión puede contener secuencias de ácidos nucleicos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped. Las secuencias de ácidos nucleicos adicionales permiten que el vector se integre en el genoma de la célula huésped en una o más ubicación(es) precisa(s) en el o los cromosomas. Para aumentar la probabilidad de integración en un lugar preciso, los elementos de integración preferiblemente deben contener una cantidad suficiente de ácidos nucleicos, por ejemplo entre 100 y 10.000 pares de bases, preferiblemente entre 400 y 10.000 pares de bases y más preferiblemente entre 800 y 10.000 pares de bases, que sean altamente homólogos con la correspondiente secuencia diana para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos de integración pueden ser secuencias de ácidos nucleicos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0145] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite que el vector se replique de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. Algunos ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son P15A ori o los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 (cuyo plásmido tiene

el P15A ori), o pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 o pAM β 1 que permite la replicación en *Bacillus*. Algunos ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micrones, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6. El origen de replicación puede tener una mutación que haga que su funcionamiento sea sensible a la temperatura en la célula huésped (véase, por ejemplo, Ehrlich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1433 [1978]).

[0146] Para aumentar la producción del producto génico se puede insertar en la célula huésped más de una copia de una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención. Se puede obtener un aumento del número de copias de la secuencia de ácidos nucleicos integrando por lo menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo en la secuencia de ácidos nucleicos un gen marcador seleccionable amplificable cuando las células contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y de esa manera se pueden seleccionar copias adicionales de la secuencia de ácidos nucleicos, cultivando las células en presencia del agente de selección apropiado.

[0147] No es la intención limitar la presente invención a los vectores de expresión que se describen aquí. Los expertos en la técnica reconocerán que en la presente invención se puede utilizar cualquier vector de expresión adecuado. Muchos de los vectores de expresión para usar en la presente invención se pueden obtener comercialmente. Los vectores de expresión comerciales que son adecuados incluyen, de manera no taxativa, a: vectores de expresión p3xFLAGTM™ (Sigma-Aldrich), que incluyen un promotor de CMV y un sitio de poliadenilación de hGH para la expresión en células huésped de mamíferos y un origen de replicación pBR322 y marcadores de resistencia a la ampicilina para la amplificación en *E. coli*. Otros vectores de expresión adecuados que se pueden obtener en el mercado incluyen, de manera no taxativa, a: los vectores pBluescriptII SK(-) y pBK-CMV (Stratagene), y plásmidos derivados de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pREP4, pCEP4 (Invitrogen) o pPoly (véase, Lathe y colaboradores, *Gene* 57:193-201 [1987]).

Células huésped para la expresión de polipéptidos modificados

[0148] La presente invención también provee una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido cetorredutasa mejorado de la presente invención, donde el polinucleótido está conectado operativamente a una o más secuencias de control para la expresión de la enzima cetorredutasa en la célula huésped. Las células huésped para

usar en la expresión de los polipéptidos KRED codificados por los vectores de expresión de la presente invención son bien conocidas en el arte e incluyen, de manera no taxativa, a: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus minor*, células de *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levaduras (por ejemplo, de *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (número de registro de ATCC 201178)); células de insectos tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera Sf9*; células animales tales como CHO, COS, BHK, 293 y células de melanoma de Bowes; y células vegetales. Los medios de cultivo y las condiciones de cultivo apropiadas para las células huésped descritas anteriormente son bien conocidos en el arte.

[0149] Los polinucleótidos para la expresión de la cetorreductasa se pueden introducir en las células mediante diversos métodos conocidos en el arte. Las técnicas incluyen, de manera no taxativa: electroporación, bombardeo de partículas biolísticas, transfección mediada por liposomas, transfección con cloruro de calcio y fusión de protoplastos. Los diversos métodos para introducir polinucleótidos en las células serán evidentes para los expertos en la materia.

[0150] Una cepa huésped que se puede utilizar en la presente invención es *Escherichia coli* W3110, aunque no es la intención limitar la presente invención a esta cepa huésped específica. El vector de expresión se creó mediante la conexión operativa de un polinucleótido que codifica una enzima mejorada en el plásmido pCK110900 conectado operativamente al promotor *lac* bajo el control del represor *lacI*. El vector de expresión también contenía el origen de replicación P15a y el gen de resistencia al cloranfenicol. Las células que contienen el polinucleótido en cuestión en *Escherichia coli* W3110 se pueden aislar sometiendo a dichas células a una selección con cloranfenicol.

Métodos de generación de polipéptidos cetorreductasa modificados

[0151] En algunas formas de realización, para preparar los polinucleótidos y polipéptidos KRED mejorados de la presente invención, la enzima cetorreductasa de origen natural que cataliza la reacción de reducción se obtiene (o deriva) de *Lactobacillus kefir*. En algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótidos original tiene codones optimizados para mejorar la expresión de la cetorreductasa en una célula huésped específica. Como ilustración, se construyó la secuencia polinucleotídica original que codifica el polipéptido KRED de tipo salvaje de *Lactobacillus kefir*, a partir de oligonucleótidos preparados en base a la secuencia polipeptídica conocida de la secuencia KRED de *Lactobacillus kefir* disponible en la base de datos Genbank. Se realizó la optimización de codones de la secuencia de

polinucleótidos original para la expresión en *E. coli* y el polinucleótido con codones optimizados se clonó en un vector de expresión, colocando la expresión del gen de cetorreductasa bajo el control del promotor *lac* y el gen represor *lacI*. Se identificaron los clones que expresaban la cetorreductasa activa en *E. coli* y se secuenciaron dichos genes para confirmar su identidad.

[0152] En algunas formas de realización, las cetorreductasas modificadas se obtienen sometiendo al polinucleótido que codifica la cetorreductasa de origen natural a mutagénesis y/o a métodos de evolución dirigida, según se expuso anteriormente. La mutagénesis se puede realizar de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas en el arte, incluyendo a las mutagénesis aleatoria y específica de sitio. La evolución dirigida se puede realizar con cualquiera de las técnicas conocidas en el arte para detectar variantes mejoradas del promotor, que incluyen por ejemplo el entremezclado,. Los métodos de mutagénesis y evolución dirigida son bien conocidos en el arte (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252, 5.837.458, 5.928.905, 6.096.548, 6.117.679, 6.132.970, 6.165.793, 6.180.406, 6.251.674, 6.265.201, 6.277.638, 6.287.861, 6.287.862, 6.291.242, 6.297.053, 6.303.344, 6.309.883, 6.319.713, 6.319.714, 6.323.030, 6.326.204, 6.335.160, 6.335.198, 6.344.356, 6.352.859, 6.355.484, 6.358.740, 6.358.742, 6.365.377, 6.365.408, 6.368.861, 6.372.497, 6.337.186, 6.376.246, 6.379.964, 6.387.702, 6.391.552, 6.391.640, 6.395.547, 6.406.855, 6.406.910, 6.413.745, 6.413.774, 6.420.175, 6.423.542, 6.426.224, 6.436.675, 6.444.468, 6.455.253, 6.479.652, 6.482.647, 6.483.011, 6.484.105, 6.489.146, 6.500.617, 6.500.639, 6.506.602, 6.506.603, 6.518.065, 6.519.065, 6.521.453, 6.528.311, 6.537.746, 6.573.098, 6.576.467, 6.579.678, 6.586.182, 6.602.986, 6.605.430, 6.613.514, 6.653.072, 6.686.515, 6.703.240, 6.716.631, 6.825.001, 6.902.922, 6.917.882, 6.946.296, 6.961.664, 6.995.017, 7.024.312, 7.058.515, 7.105.297, 7.148.054, 7.220.566, 7.288.375, 7.384.387, 7.421.347, 7.430.477, 7.462.469, 7.534.564, 7.620.500, 7.620.502, 7.629.170, 7.702.464, 7.747.391, 7.747.393, 7.751.986, 7.776.598, 7.783.428, 7.795.030, 7.853.410, 7.868.138, 7.783.428, 7.873.477, 7.873.499, 7.904.249, 7.957.912, 7.981.614, 8.014.961, 8.029.988, 8.048.674, 8.058.001, 8.076.138, 8.108.150, 8.170.806, 8.224.580, 8.377.681, 8.383.346, 8.457.903, 8.504.498, 8.589.085, 8.762.066, 8.768.871, 9.593.326, y todas las contrapartes que no son de EE.UU. relacionadas; Ling y colaboradores, *Anal. Biochem.*, 254(2):157-78 [1997]; Dale y colaboradores, *Meth. Mol. Biol.*, 57:369-74 [1996]; Smith, *Ann. Rev. Genet.*, 19:423-462 [1985]; Botstein y colaboradores, *Science*, 229:1193-1201 [1985]; Carter, *Biochem. J.*, 237:1-7 [1986]; Kramer y colaboradores, *Cell*, 38:879-887

[1984]; Wells y colaboradores, *Gene*, 34:315-323 [1985]; Minshull y colaboradores, *Curr. Op. Chem. Biol.*, 3: 284-290 [1999]; Christians y colaboradores, *Nat. Biotechnol.*, 17: 259-264 [1999]; Crameri y colaboradores, *Nature*, 391: 288-291 [1998]; Crameri, y colaboradores, *Nat. Biotechnol.*, 15:436-438 [1997]; Zhang y colaboradores, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:4504-4509 [1997]; Crameri y colaboradores, *Nat. Biotechnol.*, 14:315-319 [1996]; Stemmer, *Nature*, 370:389-391 [1994]; Stemmer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:10747-10751 [1994]; WO 95/22625; WO 97/0078; WO 97/35966; WO 98/27230; WO 00/42651; WO 01/75767; y WO 2009/152336, todos los cuales se incorporan aquí por referencia).

[0153] Los clones que se obtienen después del tratamiento de mutagénesis se seleccionan para detectar las cetorreductasas modificadas que tengan una propiedad enzimática mejorada que se desee. La medición de la actividad enzimática de las bibliotecas de expresión se puede realizar mediante la técnica bioquímica estándar de seguimiento de la velocidad de disminución (a través de una disminución en la absorbancia o la fluorescencia) de la concentración de NADH o NADPH, a medida que se convierte en NAD^+ o NADP^+ . En esta reacción, el NADH o NADPH es consumido (oxidado) por la cetorreductasa a medida que la cetorreductasa reduce una cetona del sustrato al grupo hidroxilo correspondiente. La velocidad de disminución de la concentración de NADH o NADPH, medida por la disminución de la absorbancia o la fluorescencia, por unidad de tiempo indica la actividad relativa (enzimática) del polipéptido KRED en una cantidad fija del lisado (o un polvo liofilizado elaborado a partir del mismo). La estereoquímica de los productos se puede determinar mediante diversas técnicas conocidas y según se provee en los Ejemplos. Cuando la propiedad enzimática mejorada que se desea es la estabilidad térmica, se puede medir la actividad enzimática después de someter las preparaciones enzimáticas a una temperatura definida y medir la cantidad de actividad enzimática que queda después de los tratamientos térmicos. Luego de eso, se aíslan los clones que contienen un polinucleótido que codifica una cetorreductasa, se secuencian para identificar los cambios en la secuencia de nucleótidos (si los hay) y se utilizan para expresar la enzima en una célula huésped.

[0154] Cuando se conoce la secuencia del polipéptido modificado, los polinucleótidos que codifican la enzima se pueden preparar utilizando métodos estándar en fase sólida, de acuerdo con métodos de síntesis conocidos. En algunas formas de realización, se pueden sintetizar individualmente fragmentos de hasta aproximadamente 100 bases y luego se pueden unir (por ejemplo, utilizando métodos de ligación enzimática o química, o métodos

mediados por polimerasa) para formar cualquier secuencia continua que se desee. Por ejemplo, los polinucleótidos y oligonucleótidos de la invención se pueden preparar mediante síntesis química (por ejemplo, utilizando el método clásico de fosforamidita descrito por Beaucage y colaboradores, *Tet. Lett.*, 22:1859-69 [1981], o el método descrito por Matthes y colaboradores, *EMBO J.*, 3:801-05 [1984], como se hace típicamente en los métodos de síntesis automatizados). De acuerdo con el método de la fosforamidita, los oligonucleótidos se sintetizan (por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático), se purifican, hibridan, ligan y clonan en vectores apropiados. Además, se puede obtener esencialmente cualquier ácido nucleico de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales (por ejemplo, The Midland Certified Reagent Company, Midland, TX, The Great American Gene Company, Ramona, CA, ExpressGen Inc. Chicago, IL, Operon Technologies Inc., Alameda, CA, y muchos otros).

[0155] Las enzimas cetorredutasa modificadas expresadas en una célula huésped se pueden recuperar de las células y/o del medio de cultivo usando una o más cualesquiera de las técnicas bien conocidas para la purificación de proteínas, que incluyen, de manera no taxativa: tratamiento con lisozimas, sonicación, filtración, precipitación con sales, ultracentrifugación y cromatografía. Las soluciones adecuadas para la lisis y la extracción de alta eficiencia de proteínas de bacterias, por ejemplo de *E. coli*, se pueden obtener comercialmente con el nombre comercial CellLytic B™ (Sigma-Aldrich).

[0156] Las técnicas cromatográficas para el aislamiento de los polipéptidos cetorredutasa incluyen, de manera no taxativa, a: cromatografía de fase reversa, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel y cromatografía de afinidad. Las condiciones para purificar una enzima en particular dependerán, en parte, de factores tales como: carga neta, carácter hidrofóbico, carácter hidrofílico, peso molecular, forma molecular, etc., y serán evidentes para los expertos en la técnica.

[0157] En algunas formas de realización, para aislar las enzimas cetorredutasa mejoradas se utilizan técnicas de afinidad. Para la purificación por cromatografía de afinidad, se puede usar cualquier anticuerpo que se una específicamente al polipéptido cetorredutasa. Para la producción de anticuerpos, se pueden inmunizar mediante inyección con cetorredutasa diversos animales huéspedes, incluyendo, entre otros, a conejos, ratones, ratas, etc. El polipéptido cetorredutasa se puede unir a un vehículo adecuado, como BSA, por medio de un grupo funcional de cadena lateral o conectores unidos a un grupo funcional de cadena lateral. Para aumentar la respuesta inmunológica se pueden usar diversos coadyuvantes,

dependiendo de la especie huésped, incluyendo, de manera no taxativa, al de Freund (completo e incompleto), geles minerales como el hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas como la lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol y coadyuvantes humanos potencialmente útiles como BCG (Bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

[0158] Las cetorreductasas se pueden preparar y usar en forma de células que expresan las enzimas, como extractos crudos o como preparaciones aisladas o purificadas. Las cetorreductasas se pueden preparar como liofilizados, en forma de polvo (por ejemplo, polvos de acetona) o se pueden preparar como soluciones enzimáticas. En algunas formas de realización, las cetorreductasas pueden estar en forma de preparaciones sustancialmente puras.

[0159] En algunas formas de realización, los polipéptidos cetorreductasa se pueden unir a un sustrato sólido. El sustrato puede ser una fase sólida, una superficie y/o una membrana. Un soporte sólido puede estar compuesto por polímeros orgánicos tales como poliestireno, polietileno, polipropileno, polifluoroetileno, polietilenoxi y poliacrilamida, así como copolímeros e injertos de los mismos. Un soporte sólido también puede ser inorgánico, tal como vidrio, sílice, vidrio de porosidad controlada (CPG), sílice de fase reversa o metal, tal como oro o platino. La configuración del sustrato puede ser en forma de perlas, esferas, partículas, gránulos, gel, membrana o superficies. Las superficies pueden ser planas, sustancialmente planas o no planas. Los soportes sólidos pueden ser porosos o no porosos y pueden hincharse o no. Un soporte sólido se puede configurar en forma de pocillo, depresión u otro tipo de contenedor, recipiente, característica o ubicación. Se puede configurar una pluralidad de soportes, formando una matriz o arreglo con diversas ubicaciones, direccionables para la entrega robótica de reactivos, o por métodos de detección y/o instrumentos.

[0160] Como saben los expertos en la técnica, las reacciones de reducción catalizadas por cetorreductasa normalmente requieren un cofactor. Las reacciones de reducción catalizadas por las enzimas cetorreductasa modificadas que se describen en la presente típicamente también requieren un cofactor, aunque muchas formas de realización de las cetorreductasas modificadas requieren mucho menos cantidad del cofactor que las reacciones catalizadas con enzimas cetorreductasa de tipo salvaje. Tal como se usa en la presente, el término "cofactor" se refiere a un compuesto no proteico que funciona en combinación con una enzima cetorreductasa. Los cofactores adecuados para usar con las enzimas cetorreductasa

modificadas que se describen en la presente incluyen, de manera no taxativa, a: NADP^+ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), NADPH (la forma reducida de la NADP^+), NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido) y NADH (la forma reducida de la NAD^+). Por lo general, a la mezcla de reacción se le agrega la forma reducida del cofactor. Opcionalmente, la forma reducida de la NAD(P)H se puede regenerar a partir de la forma oxidada de NAD(P)^+ usando un sistema de regeneración de cofactores. El término “sistema de regeneración de cofactor” se refiere a un conjunto de reactivos que participan en una reacción que reduce la forma oxidada del cofactor (por ejemplo, NADP^+ a NADPH). El sistema de regeneración de cofactores regenera la forma reducida de los cofactores oxidados por la reducción del sustrato cetónico catalizada por cetorreductasa. Los sistemas de regeneración de cofactores comprenden un reductor estequiométrico que es una fuente de equivalentes de hidrógeno reductores y es capaz de reducir la forma oxidada del cofactor. El sistema de regeneración del cofactor puede comprender además un catalizador, por ejemplo, un catalizador enzimático que cataliza la reducción por el reductor de la forma oxidada del cofactor. El sistema de regeneración del cofactor también puede comprender un cosustrato como el isopropanol. Los sistemas de regeneración de cofactores para regenerar NADH o NADPH a partir de NAD^+ o NADP^+ , respectivamente, son conocidos en el arte y se pueden usar en los métodos que se describen en la presente.

EXPERIMENTOS

[0161] En los siguientes ejemplos representativos, que pretenden ser ilustrativos y no limitantes, se ilustran diversas características y formas de realización de la invención.

[0162] En la siguiente divulgación de experimentos se aplican las siguientes abreviaturas: ppm (partes por millón); M (molar); mM (milimolar), uM y μM (micromolar); nM (nanomolar); mol (moles); gm y g (gramo); mg (miligramos); ug y μg (microgramos); l (litro); ml (mililitro); cm (centímetros); mm (milímetros); um y μm (micrómetros); s (segundos); min(s) (minuto(s)); h(s) y hr(s) (hora(s)); U (unidades); PM (peso molecular); rpm (rotaciones por minuto); $^{\circ}\text{C}$ (grados centígrados); T_{Amb} (temperatura ambiente); CDS (secuencia codificante); ADN (ácido desoxirribonucleico); ARN (ácido ribonucleico); HPLC (cromatografía líquida de alta resolución); FIOPC (veces de mejora sobre el control positivo, por las siglas en inglés de *fold improvement over positive control*); HTP (alto rendimiento); LB (caldo Luria); KPO_4 (fosfato de potasio); KPO_3 (fosfito de potasio); TEoA (trietanolamina); PMBS (sulfato de polimixina B); Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO); Millipore (Millipore, Corp., Billerica MA); Difco (Difco Laboratories, BD Diagnostic Systems, Detroit, MI); Daicel (Daicel, West Chester, PA); Genetix (Genetix USA, Inc., Beaverton, OR); Molecular Devices (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA); Applied Biosystems (Applied Biosystems, parte de Life Technologies, Corp., Grand Island, NY), Agilent (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA); Thermo Scientific (parte de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); Corning (Corning, Inc., Palo Alto, CA); y Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

[0163] En el desarrollo de la presente invención se utilizaron las siguientes secuencias.

SEQ ID NO: 413:

aacggctttgccgcgccctctcacttccctgttaagtatcttctggcatcttccaggaaatctccgcc
ccgttcgtaagccatttccgctcgccgcagtcgaacgaccgagcgtagcagtcagtgagcgaggaagcg
gaatatactctgtatcacatattctgctgacgcaccgggtgcagcctttttctctgccacatgaagcac
ttactgacaccctcatcagtgaccaccgctggtagcgggtggttttttaggcctatggcctttttt
ttgtgggaaaccttgcgggtatggtattaaagcgcccggaagagagtcattcagggtggtgaatgtga
aaccagtaacgttatacagtgctgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgctggtgaa
ccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcggaaggaagcggcgatggcggagctgaattacatt
cccaaccgctggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttctgattggcgttccacctccagtctgg
ccctgcacgcgcgtcgcaattgtcggcgattaaatctcgccgatcaactgggtgccagcgtggt
ggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtgaagcctgtaaagcggcgtgcacaatcttctcgcgcaacgc
gtcagtggtgctgattacataactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcacta
atgttcggcggtattttctgtatgtctctgaccagacacctcatcaacagtatttttcccatgaaga
cggtagcgcactggcggtggagcatctggtcgcatgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcccc
ttaagtctgtctcgcgctgtcgtctggctggcgtatctcactcgcaatcaaattcagc
cgatagcgggaacgggaaggcgactggagtccatgtccggttttaacaaacatgcaaatgctgaatga
gggcatcgtttcactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctggcgcaatgcgcgccattacc
gagtccgggctgcgcgttggtgcggacatctcggtagtggtgatacgacgataccgaagacagctcatgtt
atataccgcccgttaaccacatcaaacaggattttcgctgctggggcaaacagcgtggaccgcttct
gcaactctctcagggccaggcgggttaagggaatcagctgttggcgtctcactggtgaaaagaaaaacc
accctggcgcccaatacgaaccgcctctccccgcgcttgcccgattcattaatgcagctggcacgac
aggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgggtaccgataaaagcggcttctgacaggaggccgtt
tgtttctcgagtaattaaggcagtgagcgaacgaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccc
caggctttacactttatgcttccggctcgtatgtgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacag

gaaacggctatgaccatgattacggattcactggccgtcgtttacaatctagaggccagcctggccata
aggagatatacatatgagtattcaacatttccgtgtcgccttattcccttttctcgggcattttgcctt
cctgttttctcaccagaaacgctgggtgaaagtaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgg
gttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagagcgttttccaat
gatgagcacttttaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaactc
ggtcgccgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacgg
atggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataacctagtgataaactgcggccaacttact
tctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgttttttgacaccatgggggatcatgtaactcgc
cttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctacag
caatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaacttactctagcttcccggcaacaattaat
agactggatggagcgggataaagttgcaggaccacttctgcgtcggcccttccggctggctggtttatt
gctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagc
cctcccgtatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgtaatagacagatcgc
tgagataggtgcctcactgattaagcattggggccaaactggccaccatcaccatcaccattagggaaga
gcagatgggcaagcttgacctgtgaagtgaaaaatggcgacattgtgcgacatttttttgaattcta
cgtaaaaagcagccgatacatcggtgttttttctgcagggtgaaacaaaacggttgaccacatga
agtaaacacggtagcgtgcggtagtattacacagttaaattgctaacgcagtcaggcaaagtccatgggt
tttcttccggtgaagcgcattctggtaacgggtgttgcagcaaaactatccatcgcctacggtatcgtc
aggcgtgcaccgcgaaggagctgaactggcattcacctaccagaacgacaaactgaaaggccgcgtaga
agaatttccgctcaattgggttctgacatcgttctgcagtcgcatgttgagaagatgccagcatcgac
accatgttcgctgaactggggaaagtttggccgaaatttgacggttttgtaactctattgttttgcac
ctggcgatcagctggatgggtactatgttaacgccgttaccgtgaaggcttcaaaattgccacgacat
cagctcctacagcttcgttgaatggcaaaagcttgcgctccatgctgaatccgggttctgcctgctg
accctttctaccttggcgctgagcgcgtatcccgaactacaacgttatgggtctggcaaaagcgtctc
tggaagcgaacgtgcgctatatggcgaacgcgatgggtccggaaggtgtgcgtgttaacgccatctctgc
tggtccgatccgtactctggcggcctccggtatcaaagacttccgcaaaatgctggctcattgcgaagcc
gttaccgccattcgcgtaccgttactattgaagatgtgggtaactctgcggcattcctgtgtccgac
tctctgccggtatctccggtgaagtgggtccacgttgacggcggttccagcattgctgcaatgaacgaact
cgaactgaaataactgcaggagctcaaacagcagcctgtattcagggtgcttttagaaatatttatct
gattaataagatgatcttcttgatcgttttggctcgcgctattcttctgctctgaaaacgaaaaaac
cgcttgcaggcgggttttcgaagggtctctgagctaccaactcttgaaccgaggttaactggcttga
ggagcgcagtcacaaaaactgtcctttcagtttagccttaaccggcgcatgacttcaagactaactcct
ctaatcaattaccagtgggtgctgccagtgggtgcttttgcattgtcttccgggttgactcaagacgat

agttaccggataaggcgcagcggctcggactgaacggggggttcgtgcatacagtcagcttgagcgaac
tgcctaccgggaactgagtgtcaggcgtggaatgagacaaacgcggccataacagcggaatgacaccggt
aaaccgaaaggcaggaacaggagagcgcacgaggagccgcccaggggaaacgcctggtatctttatagt
cctgtcgggtttcgcaccactgattgagcgtcagatttcgtgatgcttgcagggggcggagcctat
ggaaa (SEQ ID NO: 413)

SEQ ID NO: 414:

aacggctttgccgcccctctcacttccctgttaagtatcttctggcatcttccaggaaatctccgcc
ccgttcgtaagccatttcgctcgccgagtcgaacgaccgagcgtagcagtcagtgagcaggaagcg
gaatatactctgtatcacatattctgctgacgcaccggtgcagcctttttctcctgccacatgaagcac
ttactgacaccctcatcagtgaaccaccgctggtagcgggtgttttttaggcctatggcctttttt
ttgtgggaaacctttcgcggtatggtattaaagcggcggaagagagtcattcagggtggtgaatgtga
aaccagtaacgttatacagatgtcgcagagtatccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaa
ccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtgggaagcggcgatggcggagctgaattacatt
cccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctcagctctgg
ccctgcacgcgccgtcgaaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggt
gggtgctgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcgggtgcacaatcttctcgcgcaacgc
gtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcacta
atgttccggcgttatttctgatgtctctgaccagacacccatcaacagtatttttctccatgaaga
cggtagcgcgactggcggtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggccc
ttaagttctgtctcggcgctctgcgtctggctggctggcataaatactcactcgaatcaaattcagc
cgatagcgggaacgggaaggcactggagtgccatgtccggtttcaacaacatgcaaatgctgaatga
gggcatcgtttccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgtggcgcaatgcgcgccattacc
gagtccgggctgcgcgttggtgcggacatctcggtagtggtgatacgcgataccgaagacagctcatgtt
atatcccgccgttaaccacatcaaacaggattttcgcctgctggggcgaaccagcgtggaccgcttgc
gcaactctctcagggccaggcgggttaagggaatcagctgttgcctctcactggtgaaaagaaaaacc
accctggcgcccaatacgaaccgcctctccccgcgcgttgccgattcattaatgcagctggcagcag

aggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcggtagcccgataaaagcggcttctgacaggaggccgtt
tgtttctcgagtaattaaggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcacc
caggctttacatttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacag
gaaacggctatgaccatgattacggattcactggccgtcgtttacaatctagaggccagcctggccata
aggagatatacatatgagtattcaacatttccgtgtcgccttattcccttttctgcggcattttgcctt
cctgtttttgctcaccagaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgg
gttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttgccccgaagagcgttttccaat
gatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcgggtattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaactc
ggtcgccgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacgg
atggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataaccatgagtataactgcggccaacttact
tctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgttttttgacaccatgggggatcatgtaactcgc
cttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctacag
caatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaat
agactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttatt
gctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtgaagc
cctcccgtatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgtaatagacagatcgc
tgagataggtgcctcactgattaagcattggggccaaactggccaccatcaccatcaccattagggaaga
gcagatgggcaagcttgacctgtgaagtgaataatggcgcacattgtgcgacatttttttgaattcta
cgtaaaaagcagccgatacatcggtgctttttttctgcagggtgaaacaaaacggttgactacatga
agtaaacacgggtacggtgcggtagtttatcacagttaaattgctaacgcagtcaggcaaagtccatgggt
ttctttccggtaagcgcattctggtaacgggtgttgccagcaaaactatccatcgcctacgggtatcgtc
aggcgatgcaccgcgaaggagctgaactggcattcacctaccagaacgacaaactgaaaggccgcgtaga
agaatttccgctcaattgggttctgacatcgttctgcagtgcgatgttcagaagatgccagcatcgac
accatgttcgctgaactggggaaagtgtggccgaaattgacgggtttgtacactctattgttttgcac
ctggcgatcagctggatgggtgactatgttaacgccgttaccgtgaaggctcaaaattgccacgacat
cagctcctacagcttctgtgaatggcaaaagcttgcgctccatgctgaatccgggttctgcctgctg

acccttcctaccttggcgctgagcgcgtatcccgaaactacaacgttatgggtctggcaaaagcgtctc
 tggaagcgaacgtgcgctatatggcgaacgcgatgggtccggaaggtgtgcgtttaacgccatctctgc
 tggtcgatccgtactctggcggcctccggtatcaaagacttccgcaaatgctggctcattgcgaagcc
 gttaccccgattcgcgtaccgttactattgaagatgtgggtaactctgcggcattcctgtgctccgatc
 tctctgccggtatctccggtgaagtggccacgttgacggcggttcagcattgctgcaatgaacgaact
 cgaactgaaataactgcaggagctcaaacagcagcctgtattcaggctgcttttagaaatattttatct
 gattaataagatgatcttcttgagatcgttttggtctgcgcgtaatctcttgctctgaaaacgaaaaac
 cgccttgacaggcggttttcgaaggttctctgagctaccaactcttgaaccgaggttaactggcttggga
 ggagcgcagtcacaaaaactgtcctttcagtttagccttaaccggcgcatgactcaagactaactcct
 ctaaatcaattaccagtggctgctgccagtgggtgcttttgcatgtctttccgggtggactcaagacgat
 agttaccggataaggcgcagcggctcggactgaacggggggtcgtgcatacagtcagcttgagcgaac
 tgcctaccggaaactgagtgacaggcgtggaatgagacaaacgcggccataacagcgggaatgacaccggt
 aaaccgaaaggcaggaacaggagagcgcacagggagccgccagggggaacgcctggtatctttatagt
 cctgtcgggtttgccaccactgatttgagcgtcagatttcgtgatgctgtcaggggggaggagcctat
 ggaaa (SEQ ID NO: 414)

EJEMPLO 1

Anfitriones de expresión de E. coli que contienen genes de KRED recombinantes

[0164] Se obtuvieron las enzimas KRED iniciales que se utilizaron para producir las variantes de la presente invención de la colección Codexis de paneles de enzimas KRED que se pueden obtener comercialmente. Durante la selección inicial, la variante de la SEQ ID NO: 4 produjo la mayor cantidad de producto según se determinó por LC/MS. Los genes que codificaban la KRED se clonaron en un sistema de vector de expresión, que incluía a pCK110900 (véase la figura 3 de la publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2006/0195947), SEQ ID NO: 413, o SEQ ID NO: 414, conectado al promotor *lac* bajo el control del represor *lacI*. El sistema de vector de expresión también contenía el origen de replicación P15a y un gen de resistencia al cloranfenicol. No es la intención limitar la presente invención a los vectores de expresión que se describen en la presente. Los expertos en la técnica reconocerán que en la presente invención se puede usar cualquier vector de

expresión adecuado, incluyendo, de manera no taxativa, a: los vectores de expresión p3xFLAGTM™ (Sigma-Aldrich), los vectores pBluescriptII SK(-) y pBK-CMV (Stratagene), y plásmidos derivados de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pREP4, pCEP4 (Invitrogen) o pPoly (véase, Lathe y colaboradores, *Gene* 57:193-201 [1987]).

[0165] Los plásmidos que se obtuvieron como resultados se transformaron en *E. coli* W3110, utilizando métodos estándar conocidos en el arte. Se aislaron los transformantes sometiendo a las células a selección con cloranfenicol, como es sabido en este campo (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 8.383.346 y WO 2010/144103).

EJEMPLO 2

Preparación de pellets de células húmedos que contienen KRED HTP

[0166] Se inocularon células de *E. coli* que contenían genes codificantes de KRED recombinante de colonias monoclonales en 190 µl de caldo Luria que contenía glucosa al 1 % y 30 µg/ml de cloranfenicol en los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos poco profundos. Se sellaron las placas con sellos permeables al O₂ y los cultivos se cultivaron durante la noche a 20 °C, a 200 rpm y 85 % de humedad. Luego de eso, se transfirieron 20 µl de cada uno de los cultivos celulares a los pocillos de placas de 96 pocillos profundos que contenían 380 µl de TB y 30 µg/ml de CAM. Se sellaron las placas de pocillos profundos con sellos permeables al O₂ y se incubaron a 30 °C, a 250 rpm y 85 % de humedad hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Luego, se indujeron los cultivos celulares con IPTG a una concentración final 1 mM y se incubaron durante la noche en las mismas condiciones que se usaron originalmente. Luego de eso, se sedimentaron las células por centrifugación a 4 °C, a 4.000 rpm durante 10 min. Se descartaron los sobrenadantes y se congelaron los pellets a -80 °C antes de la lisis.

EJEMPLO 3

Preparación de lisados celulares que contienen KRED HTP

[0167] En primer lugar, se lisaron los pellets de células que se produjeron como se describe en el Ejemplo 2 por agregando de 150 µl de solución reguladora de pH de lisis que contenía trietanolamina*H₂SO₄ 100 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM o fosfato de potasio pH 8 100 mM con MgSO₄ 2 mM, 1 g/l de lisozima y 0,5 g/l de PMBS. Luego, se agitaron los pellets de células a la temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de mesada. Se centrifugaron las placas a 4.000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C para eliminar los detritos celulares. Luego,

se usaron los sobrenadantes en reacciones biocatalíticas para determinar sus niveles de actividad.

EJEMPLO 4

Preparación de lisados liofilizados a partir de cultivos en matraces de agitación (SF)

[0168] Los procedimientos de matraz de agitación se pueden usar para generar polvos de matraz de agitación (SFP, por las siglas en inglés de *Shake-Flask Powders*) de polipéptido KRED modificado, que son útiles para ensayos de selección secundarios y/o para usar en los procesos biocatalíticos que se describen en la presente. La preparación de enzimas en forma de polvo de matraz de agitación (SFP) provee un preparado de la enzima modificada más purificada (por ejemplo, hasta un 30 % de la proteína total), en comparación con el lisado celular que se utiliza en los ensayos de HTP y también permite el uso de soluciones más concentradas de la enzima. Para comenzar, los cultivos de HTP seleccionados que se cultivaron como se describió anteriormente se sembraron en placas de agar/caldo Luria con glucosa al 1% y 30 mg/ml de cloranfenicol (CAM) y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Se transfirió una sola colonia de cada cultivo a 6 ml de caldo Luria con glucosa al 1% y 30 µg/ml de CAM. Los cultivos se cultivaron durante 18 h a 30 °C, a 250 rpm y se subcultivaron a aproximadamente 1:50 en 250 ml de TB que contenía 30 mg/ml de CAM, hasta una DO₆₀₀ final de 0,05. Los cultivos se cultivaron durante aproximadamente 3 horas a 30 °C a 250 rpm hasta una DO₆₀₀ entre 0,8-1,0 y se indujeron con IPTG 1 mM. Luego de eso, los cultivos se cultivaron durante 20 h a 30 °C a 250 rpm. Los cultivos se centrifugaron (4.000 rpm durante 20 min a 4 °C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en 35 ml de fosfato de potasio 50 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM. Se centrifugaron las células resuspendidas (4.000 rpm durante 20 min a 4 °C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en 6 ml de fosfato de potasio 50 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM y se lisaron las células usando un disruptor celular de Constant Systems (One Shot). Se sedimentaron los lisados (10 000 rpm durante 60 min a 4 °C) y los sobrenadantes se congelaron y liofilizaron para generar las enzimas de matraz de agitación (SF, las siglas en inglés de *Shake Flask*).

EJEMPLO 5

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de la SEQ ID NO: 4 para mejorar la actividad KRED

[0169] Se seleccionó a la SEQ ID NO: 4 como la enzima original en base a los resultados de la selección de variantes para la reducción del sustrato iso- α -ácido. Se produjeron bibliotecas de genes modificados usando técnicas bien establecidas (por ejemplo, mutagénesis de saturación y recombinación de mutaciones beneficiosas identificadas previamente). Se produjeron en HTP los polipéptidos codificados por cada gen tal como se describe en el Ejemplo 2, y se generó el lisado soluble según se describe en el Ejemplo 3.

[0170] Se utilizó el polinucleótido modificado que codifica el polipéptido con actividad KRED de la SEQ ID NO: 4 (es decir, la SEQ ID NO: 3) para generar los polipéptidos modificados adicionales de la Tabla 5-1. Estos polipéptidos mostraron una formación mejorada de dihidro-(rho)-iso- α -ácidos a partir de iso- α -ácidos en comparación con el polipéptido de partida. Se generaron los polipéptidos modificados a partir de la secuencia de aminoácidos del "esqueleto principal" de la SEQ ID NO: 4 usando métodos de evolución dirigida según se describió anteriormente junto con el ensayo de HTP y los métodos analíticos que se describen más adelante en la Tabla 5-2.

[0171] Se comenzó la evolución dirigida con el polinucleótido que se establece en la SEQ ID NO: 3. Luego de eso, se seleccionaron polipéptidos modificados como secuencias génicas del "esqueleto principal" de partida. Se generaron bibliotecas de polipéptidos modificados utilizando diversas técnicas bien conocidas (por ejemplo, mutagénesis por saturación, recombinación de diferencias de aminoácidos beneficiosas identificadas previamente) y se seleccionaron utilizando métodos de ensayo y análisis de HTP con los que se midió la capacidad de los polipéptidos de convertir los sustratos iso- α -ácidos en el producto dihidro-(rho)-iso- α -ácido que se deseaba.

[0172] El ensayo enzimático se llevó a cabo en un formato de 96 pocillos, en un volumen total de 200 μ l/pocillo, que incluía 50 % v/v de lisado enzimático de HTP, 8 g/l de sustrato iso- α -ácido (solución de extracto de lúpulo isomerizado Isolone®, de Kalsec) y 0,1 g/l de NADP en isopropanol (IPA) al 40 % en volumen en trietanolamina*H₂SO₄ 100 mM a pH 8, con MgSO₄ 2 mM. Se sellaron las placas y se incubaron a 40 °C con agitación a 600 rpm durante 20-24 horas.

[0173] Después de 20-24 horas, se agregaron 1000 μ l de acetonitrilo con ácido acético al 0,1 %. Se sellaron las placas y se centrifugaron a 4.000 rpm a 4 °C durante 10 min. La muestra

inactivada se diluyó adicionalmente 4-5x en una mezcla de acetonitrilo:agua 50:50 antes de realizar el análisis por HPLC. Los parámetros de la corrida de HPLC se describen a continuación en la Tabla 5-2.

Tabla 5-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 4		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 4)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 4)¹
5/6	L196K	++++
7/8	L196R	+++
9/10	L153R	+++
11/12	L145S	+++
13/14	T152G	++
15/16	L196H	++
17/18	I93V	++
19/20	L145M	++
21/22	L145G	++
23/24	L145C	+
25/26	L153V	+
27/28	D197R	+
29/30	L21R	+
31/32	I93D	+
33/34	V148I	+
35/36	L153C	+
37/38	E200Q	+
39/40	P194R	+

Tabla 5-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 4		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 4)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 4)¹
41/42	E200R	+
43/44	M206V	+
45/46	I93M	+
47/48	D197G	+
49/50	P194N	+
51/52	E200L	+
53/54	L110I	+
55/56	I226L	+
57/58	I93T	+
59/60	T212S	+
61/62	P194H	+
63/64	T152S	+
65/66	V12I	+
67/68	K97G	+
69/70	V87L	+
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 4 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,0 pero < 2,0, "++" ≥ 2 pero ≤ 4, "+++" ≥ 4 pero ≤ 8, "++++" ≥ 8		

Tabla 5-2. Parámetros de la HPLC	
Instrumento	Agilent 1100 HPLC
Columna	Columna Waters XBridge Phenyl 30 x 50 mm 2,7 µm
Fase móvil	A: ácido acético al 0,1 % en agua, B: ácido acético al 0,1 % en

Tabla 5-2. Parámetros de la HPLC			
	acetonitrilo		
Parámetros de la corrida	42:58 A/B durante 1 minuto; rampa a 10:90 A/B durante 1 minuto		
Caudal	1,5 ml/min		
Tiempo de la corrida	2,0 min		
Tiempos de retención de los picos	<u>Tiempo de retención del comp. [min]</u>		<u>nota.</u>
	Iso-1	0,6	mezcla de isómeros co-Iso
	Iso-2	0,7	mezcla de isómeros n/ad-Iso
	Iso-3	0,8	mezcla de isómeros n/ad-Iso
	Rho-1	1,0	mezcla de isómeros co-Rho
	Rho-2	1,2	mezcla de isómeros n/ad-Rho
	Rho-3	1,4	mezcla de isómeros n/ad-Rho
Temperatura de la columna	50 °C		
Volumen de inyección	10 µl		
Detección	260 nm		

EJEMPLO 6

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de la SEQ ID NO: 6 para mejorar la actividad KRED

[0174] Se produjeron bibliotecas de genes modificados usando técnicas bien establecidas (por ejemplo, mutagénesis de saturación y recombinación de mutaciones beneficiosas identificadas previamente). Los polipéptidos codificados por cada gen se produjeron en HTP como se describe en el Ejemplo 2, y se generó el lisado soluble como se describe en el Ejemplo 3.

[0175] Se utilizó el polinucleótido modificado que codifica el polipéptido con actividad KRED de la SEQ ID NO: 6 (es decir, la SEQ ID NO: 5) para generar los polipéptidos modificados adicionales de la Tabla 6-1. Estos polipéptidos mostraron una formación mejorada de dihidro-(rho)-iso- α -ácidos a partir de iso- α -ácidos en comparación con el polipéptido de partida. Se generaron los polipéptidos modificados a partir de la secuencia de

aminoácidos del "esqueleto principal" de la SEQ ID NO: 6 usando métodos de evolución dirigida según se describió anteriormente junto con el ensayo de HTP y los métodos analíticos que se describen a continuación en la Tabla 5-2.

[0176] Se inició la evolución dirigida con el polinucleótido que se establece en la SEQ ID NO: 5. Luego de eso, se seleccionaron polipéptidos modificados como secuencias génicas del "esqueleto principal" de partida. Se generaron bibliotecas de polipéptidos modificados utilizando diversas técnicas bien conocidas (por ejemplo, mutagénesis por saturación, recombinación de diferencias de aminoácidos beneficiosas identificadas previamente) y se seleccionaron utilizando métodos de ensayo y análisis de HTP con los que se midió la capacidad de los polipéptidos de convertir los sustratos iso- α -ácidos en el producto dihidro-(rho)-iso- α -ácido que se deseaba.

[0177] El ensayo enzimático se llevó a cabo en un formato de 96 pocillos, en un volumen total de 200 μ l/pocillo, que incluía lisado enzimático de HTP al 50 % v/v, 16 o 40 g/l de sustrato iso- α -ácido (solución de extracto de lúpulo isomerizado Isolone®, de Kalsec), y 0,1 g/l de NADP en isopropanol (IPA) al 40 % en volumen en trietanolamina*H₂SO₄ 100 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM. Se sellaron las placas y se incubaron a 40 °C con agitación a 600 rpm durante 20-24 horas.

[0178] Después de 20-24 horas, se agregaron 1000 μ l de acetonitrilo con ácido acético al 0,1 %. Se sellaron las placas y centrifugaron a 4.000 rpm a 4 °C durante 10 min. La muestra inactivada se diluyó adicionalmente 10-20x en una mezcla de acetonitrilo:agua 50:50 antes de realizar el análisis por HPLC. Los parámetros de la corrida de HPLC se describen en la Tabla 5-2.

Tabla 6-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 6		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 6)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 6)¹
71/72	V12I;L145M	++++
73/74	L145M	+++
75/76	V87L;L110I;L145M	+++
77/78	L145M;T152G	+++

Tabla 6-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 6		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 6)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 6)¹
79/80	V87L;L110I;L145M	+++
81/82	V12I;L110I;L145M;T152G	++
83/84	L110I;L145M;P194H	++
85/86	L110I;L145M;T152G;D197G	+
87/88	V87L;L110I;L145M;P194N	+
89/90	V87L;L110I;L145M;P194H	+
91/92	T152S	+
93/94	L145M;D197G;I226L	+
95/96	V87L;L145M;P194H	+
97/98	L110I	+
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de las SEQ ID NO: 6 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,0 pero < 2,0, "++" ≥ 2 pero ≤ 4, "+++" ≥ 4 pero ≤ 8, "++++" ≥ 8		

EJEMPLO 7

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de la SEQ ID NO: 80 para mejorar la actividad KRED

[0179] Se produjeron bibliotecas de genes modificados utilizando técnicas bien establecidas (por ejemplo, mutagénesis de saturación y recombinación de mutaciones beneficiosas identificadas previamente). Los polipéptidos codificados por cada gen se produjeron en HTP como se describe en el Ejemplo 2, y se generó el lisado soluble como se describe en el Ejemplo 3.

[0180] Se utilizó el polinucleótido modificado que codifica el polipéptido con actividad KRED de la SEQ ID NO: 80 (es decir, la SEQ ID NO: 79) para generar los polipéptidos modificados adicionales de la Tabla 7-1. Estos polipéptidos mostraron una formación

mejorada de dihidro-(rho)-iso- α -ácidos a partir de iso- α -ácidos en comparación con el polipéptido de partida. Se generaron los polipéptidos modificados a partir de la secuencia de aminoácidos del "esqueleto principal" de la SEQ ID NO: 80 usando métodos de evolución dirigida según se describió anteriormente, junto con el ensayo de HTP y los métodos analíticos que se describen a continuación en la Tabla 5-2.

[0181] Se inició la evolución dirigida con el polinucleótido que se establece en la SEQ ID NO: 79. Luego de eso, se seleccionaron polipéptidos modificados como secuencias génicas del "esqueleto principal" de partida. Se generaron bibliotecas de polipéptidos modificados utilizando diversas técnicas bien conocidas (por ejemplo, mutagénesis por saturación, recombinación de diferencias de aminoácidos beneficiosas identificadas previamente) y se seleccionaron utilizando métodos de ensayo y análisis de HTP con los que se midió la capacidad de los polipéptidos de convertir los sustratos iso- α -ácidos en el producto dihidro-(rho)-iso- α -ácido que se deseaba.

[0182] El ensayo enzimático se llevó a cabo en un formato de 96 pocillos, en un volumen total de 200 μ l/pocillo, que incluía lisado enzimático de HTP al 25 % v/v, 60 u 80 g/l de sustrato iso- α -ácido (solución de extracto de lúpulo isomerizado Isolone®, de Kalsec), y 0,02 g/l de NADP en isopropanol (IPA) al 40% en volumen en fosfato de potasio 100 mM a pH 8 con MgSO_4 2 mM. Se sellaron las placas y se incubaron a 45 °C con agitación a 600 rpm durante 20-24 horas.

[0183] Después de 20-24 horas, se agregaron 1000 μ l de acetonitrilo con ácido acético al 0,1 %. Se sellaron las placas y centrifugaron a 4.000 rpm a 4 °C durante 10 min. La muestra inactivada se diluyó adicionalmente 20-40x en una mezcla de acetonitrilo:agua 50:50 antes de realizar el análisis por HPLC. Los parámetros de la corrida de HPLC se describen en la Tabla 5-2.

Tabla 7-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 80		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 80)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 80)¹
99/100	L211R	++++
101/102	L17S	++++

Tabla 7-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 80		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 80)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 80)¹
103/104	L17Q	+++
105/106	D198A	+++
107/108	T152K	+++
109/110	D101T	+++
111/112	I110V	+++
113/114	D101C	++
115/116	P190A	++
117/118	V56C	++
119/120	A162G	++
121/122	V95I	++
123/124	T210W	++
125/126	T210F	++
127/128	L21A	++
129/130	C227V	+
131/132	K46V	+
133/134	D101L	+
135/136	D198Q	+
137/138	T152L	+
139/140	E79L	+
141/142	K72A	+

Tabla 7-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 80		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 80)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 80)¹
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 80 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,0 pero < 2,0, "++" ≥ 2 pero ≤ 4, "+++" ≥ 4 pero ≤ 8, "++++" > 8		

EJEMPLO 8

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de la SEQ ID NO: 80 para mejorar la actividad KRED

[0184] Se produjeron bibliotecas de genes modificados usando técnicas bien establecidas (por ejemplo, mutagénesis de saturación y recombinación de mutaciones beneficiosas identificadas previamente). Los polipéptidos codificados por cada gen se produjeron en HTP como se describe en el Ejemplo 2, y se generó el lisado soluble como se describe en el Ejemplo 3.

[0185] Se utilizó el polinucleótido modificado que codifica el polipéptido con actividad KRED de la SEQ ID NO: 80 (es decir, la SEQ ID NO: 79) para generar los polipéptidos modificados adicionales de la Tabla 8-1. Estos polipéptidos mostraron una formación mejorada de dihidro-(rho)-iso- α -ácidos a partir de iso- α -ácidos en comparación con el polipéptido de partida. Se generaron los polipéptidos modificados a partir de la secuencia de aminoácidos del "esqueleto principal" de la SEQ ID NO: 80 usando métodos de evolución dirigida según se describió anteriormente junto con el ensayo de HTP y los métodos analíticos que se describen a continuación en la Tabla 5-2.

[0186] Se inició la evolución dirigida con el polinucleótido que se establece en la SEQ ID NO: 79. Luego de eso, se seleccionaron polipéptidos modificados como secuencias génicas del "esqueleto principal" de partida. Se generaron bibliotecas de polipéptidos modificados utilizando diversas técnicas bien conocidas (por ejemplo, mutagénesis por saturación, recombinación de diferencias de aminoácidos beneficiosas identificadas previamente) y se seleccionaron utilizando métodos de ensayo y análisis de HTP con los que se midió la capacidad de los polipéptidos de convertir los sustratos iso- α -ácidos en los productos dihidro-(rho)-iso- α -ácidos que se deseaban.

[0187] El ensayo enzimático se llevó a cabo en un formato de 96 pocillos, en un volumen total de 200 µl/pocillo, que incluía 10-20 % v/v de lisado enzimático de HTP, 80 o 160 g/l de sustrato iso- α -ácido (solución de extracto de lúpulo isomerizado Isolone®, de Kalsec), y 0,02 g/l de NADP en isopropanol (IPA) al 40% en volumen en fosfato de potasio 100 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM. Se sellaron las placas y se incubaron a 45 °C con agitación a 600 rpm durante 20-24 horas.

[0188] Después de 20-24 horas, se agregaron 1000 µl de acetonitrilo con ácido acético al 0,1 %. Se sellaron las placas y centrifugaron a 4.000 rpm a 4 °C durante 10 min. La muestra inactivada se diluyó adicionalmente 20-40x en una mezcla de acetonitrilo:agua 50:50 antes de realizar el análisis por HPLC. Los parámetros de la corrida de HPLC se describen en la Tabla 5-2.

Tabla 8-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 80		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 80)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 80)¹
143/144	P190A;P194E	++++
145/146	P194E	++++
147/148	N157C	++++
149/150	L17M	++++
99/100	L211R	++++
151/152	L17S	+++
153/154	I191T;P194E	+++
155/156	P190A;I191T;P194E	+++
103/104	L17Q	++
157/158	S159T	++
159/160	D198Q	++
139/140	E79L	+

Tabla 8-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 80		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 80)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 80)¹
161/162	D198A	+
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 80 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,0 pero < 2,0, "++" ≥ 2 pero ≤ 4, "+++" ≥ 4 pero ≤ 8, "++++" ≥ 8		

EJEMPLO 9

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de las SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 80 para mejorar la actividad KRED a altas concentraciones de sustrato [0189] Se preparó una solución madre de la enzima de 40 g/l disolviendo 200 mg de enzima en polvo en 5 ml de trietanolamina*H₂SO₄ 100 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM. Se tomó una alícuota de 2 ml y se sometió a dos diluciones 1:1 v/v sucesivas a 20 y 10 g/l cada una. A un vial abierto al aire se le agregaron 500 µl de solución madre de la enzima (10, 20 ó 40 g/l) junto con una barra de agitador. A la solución madre de la enzima agitada se le agregó una alícuota de 100 µl de 1 g/l de NADP en regulador de pH y 400 µl de 25 g/l de iso-α-ácidos en isopropanol (IPA). La composición final de la solución de reacción fue de 5, 10 ó 20 g/l de enzima, 10 g/l de iso-α-ácidos y 0,1 g/l de NADP en IPA al 40%. Se colocó el vial en un bloque calefactor a 25 °C o 40 °C y se tomaron muestras después de 1, 2, 4, 8 y 24 h y se analizaron por HPLC-UV. En la Figura 1 se muestra un perfil de reacción típico en el que se comparan la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 80.

EJEMPLO 10

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de las SEQ ID NO: 80, 104, 100, 136, 116, 132, 162, 150, 152, 144 y 146 para mejorar la actividad KRED en altas concentraciones de sustrato y bajas concentraciones de NADP

[0190] Se preparó una solución madre de la enzima de 200 g/l disolviendo 100 mg de enzima en polvo en 500 µl de regulador de pH de fosfato de potasio 100 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM y 0,1 g/l de NADP. A un pocillo de una placa de 96 pocillos profundos se le agregaron 40 µl de la solución madre de la enzima/NADP, 80 µl de isopropanol y 80 µl de una solución

acuosa al 40% en peso de iso- α -ácidos. La composición final de la solución de reacción fue: 40 g/l de enzima, 160 g/l de iso- α -ácidos y 0,02 g/l de NADP en IPA al 40%. Se selló la placa y se incubó a 40 °C durante 24 horas y luego se inactivó y se analizó por HPLC-UV. Los datos se muestran en la Tabla 11-1 y se ilustran en la Figura 2.

Tabla 10-1. Actividad KRED en alta concentración de sustrato y baja concentración de NADPH						
SEQ ID NO: (nt/aa)	% de Conversión					
	40 g/l	20 g/l	10 g/l	5 g/l	2,5 g/l	1,25 g/l
79/80	4,2	1,9	0,9	0,5	0,1	0,0
103/104	28,2	16,5	8,7	5,2	2,2	1,2
99/100	23,1	11,2	6,1	3,3	1,3	0,6
135/136	23,6	7,5	2,4	1,2	0,6	0,0
115/116	8,5	3,2	1,2	0,7	0,2	0,0
131/132	5,3	2,2	0,8	0,4	0,1	0,0
161/162	29,1	14,4	5,6	2,1	0,7	0,3
149/150	29,0	14,9	6,0	2,4	1,0	0,2
151/152	30,6	17,9	7,4	3,6	2,0	1,2
143/144	29,1	14,4	5,8	2,4	1,2	0,4
145/146	24,3	12,3	4,7	1,9	0,8	0,1
157/158	3,0	1,1	0,4	0,0	0,0	0,0

EJEMPLO 11

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de la SEQ ID NO: 104 para mejorar la actividad KRED

[0191] Se produjeron bibliotecas de genes modificados utilizando técnicas bien establecidas (por ejemplo, mutagénesis de saturación y recombinación de mutaciones beneficiosas identificadas previamente) tal como se describe en el Ejemplo 8. Los polipéptidos codificados por cada gen se produjeron en HTP como se describe en el Ejemplo 2, y se generó el lisado soluble como se describe en el Ejemplo 3.

[0192] Se utilizó el polinucleótido modificado que codifica el polipéptido con actividad KRED de la SEQ ID NO: 104 (es decir, la SEQ ID NO: 103) para generar los polipéptidos modificados mejorados adicionales de la Tabla 11-1.

Tabla 11-1. Conversión a producto de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 104		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 104)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 104)¹
163/164	Q17M/P190A/D198A	+
165/166	Q17M/K46V/D198A/L211R	+
167/168	K46V/P194E/D198Q	+
169/170	Q17M/K46V/P190A	+
171/172	Q17M/P190A/D198Q	++
173/174	K46V/P190A/P194E/D198Q	+
175/176	Q17M/I96V/P194E/D198Q	+
¹ Los niveles de conversión aumentada se determinaron con relación al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 104 y se definieron de la siguiente manera: "+" $\geq$ 4,0, "++" $\geq$ 8,0		

EJEMPLO 12

Anfitriones de expresión de *E. coli* que contienen genes de KRED recombinantes

[0193] Se obtuvieron las enzimas KRED iniciales que se utilizaron para producir las variantes de la presente invención de la colección Codexis de paneles de enzimas KRED que se pueden obtener comercialmente. Durante la selección inicial, el polipéptido de la SEQ ID NO: 172 o el polipéptido de la SEQ ID NO: 270 produjeron la mayor cantidad de producto según se determinó por LC/MS. Se clonaron los genes que codificaban la KRED en el vector de expresión de la SEQ ID NO: 413 o SEQ ID NO: 414, conectado operativamente al promotor *lac* bajo el control del represor *lacI*. El vector de expresión también contenía el origen de replicación P15a y un gen de resistencia al cloranfenicol. Los plásmidos que se obtuvieron como resultados se transformaron en *E. coli* W3110 utilizando métodos estándar conocidos en el arte. Se aislaron los transformantes sometiendo a las células a selección con triclosán, como es sabido en este campo (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 8.383.346 y WO2010/144103).

EJEMPLO 13

Preparación de pellets de células húmedos que contienen KRED HTP

[0194] Se inocularon células de *E. coli* que contenían genes codificantes de KRED recombinante de colonias monoclonales en 190 µl de caldo Luria que contenía glucosa al 1 % y 0,12 µg/ml de triclosán en los pocillos de unas placas de microtitulación de 96 pocillos poco profundos. Se sellaron las placas con sellos permeables al O₂ y los cultivos se cultivaron durante la noche a 20 °C, a 200 rpm y 85 % de humedad. Luego de eso, se transfirieron 20 µl de cada uno de los cultivos celulares a los pocillos de unas placas de 96 pocillos profundos que contenían 380 µl de TB y 30 µg/ml de CAM. Se sellaron las placas de pocillos profundos con sellos permeables al O₂ y se incubaron a 30 °C, a 250 rpm y 85 % de humedad hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Luego, se indujeron los cultivos celulares con IPTG a una concentración final 1 mM y se incubaron durante la noche en las mismas condiciones que se usaron originalmente. Luego de eso, se sedimentaron las células por centrifugación a 4 °C, a 4.000 rpm durante 10 min. Se descartaron los sobrenadantes y se congelaron los pellets a -80 °C antes de la lisis.

EJEMPLO 14

Preparación de lisados celulares que contienen KRED HTP

[0195] En primer lugar, se lisaron los pellets de células que se produjeron como se describe en el Ejemplo 2 por agregando de 150 µl de solución reguladora de pH de lisis que contenía fosfato de potasio 100 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM o fosfato de potasio 100 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM., 1 g/l de lisozima y 0,5 g/l de PMBS. Luego, se agitaron los pellets de células a la temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de mesada. Se centrifugaron las placas a 4.000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C para eliminar los detritos celulares. Luego se usaron los sobrenadantes en reacciones biocatalíticas para determinar sus niveles de actividad.

EJEMPLO 15

Preparación de lisados liofilizados a partir de cultivos en matraz de agitación (SF)

[0196] Los procedimientos en matraces de agitación se pueden usar para generar polvos de matraz de agitación (SFP) del polipéptido KRED modificado, que son útiles para ensayos de selección secundarios y/o para usar en los procesos biocatalíticos que se describen en la

presente. La preparación de enzimas en polvo de matraz de agitación (SFP) provee un preparado más purificado (por ejemplo, hasta un 30 % de la proteína total) de la enzima modificada, en comparación con el lisado celular que se utiliza en los ensayos de HTP y también permite el uso de soluciones más concentradas de la enzima. Para comenzar, se sembraron cultivos de HTP seleccionados cultivados como se describió anteriormente, en placas de agar caldo Luria con glucosa al 1 % y 0,12 µg/ml de triclosán, y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Se transfirió una sola colonia de cada cultivo a 6 ml de caldo Luria con glucosa al 1% y CAM 30 µg/ml. Los cultivos se cultivaron durante 18 h a 30 °C a 250 rpm y se subcultivaron a aproximadamente 1:50 en 250 ml de TB que contenía 0,12 mg/ml de triclosán, hasta una DO₆₀₀ final de 0,05. Los cultivos se cultivaron durante aproximadamente 3 horas a 30 °C a 250 rpm hasta una DO₆₀₀ entre 0,8-1,0 y se indujeron con IPTG 1 mM. Luego de eso, los cultivos se cultivaron durante 20 h a 30 °C a 250 rpm. Los cultivos se centrifugaron (4.000 rpm durante 20 min a 4 °C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en 35 ml de fosfato potásico 50 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM. Se centrifugaron las células resuspendidas (4.000 rpm durante 20 min a 4 °C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en 6 ml de fosfato potásico 50 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM, y se lisaron las células usando un disruptor celular de Constant Systems (One Shot). Se sedimentaron los lisados (10 000 rpm durante 60 min a 4 °C) y los sobrenadantes se congelaron y liofilizaron para obtener las enzimas de matraz de agitación (SF).

EJEMPLO 16

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de la SEQ ID NO: 172 para mejorar la actividad KRED

[0197] Se seleccionó el polipéptido de la SEQ ID NO: 172 como la enzima original en base a los resultados de la selección de variantes para la reducción del sustrato iso- α -ácido. Se produjeron bibliotecas de genes modificados usando técnicas bien establecidas (por ejemplo, mutagénesis de saturación y recombinación de mutaciones beneficiosas identificadas previamente). Los polipéptidos codificados por cada gen se produjeron en HTP como se describe en el Ejemplo 2, y se generó el lisado soluble como se describe en el Ejemplo 3.

[0198] Se utilizó el polinucleótido modificado que codifica el polipéptido con actividad KRED de la SEQ ID NO: 172 para generar los polipéptidos modificados adicionales de la Tabla 16-1. Estos polipéptidos mostraron una formación mejorada de dihidro-(rho)-iso- α -ácidos a partir de iso- α -ácidos en comparación con el polipéptido de partida. Se generaron los

polipéptidos modificados a partir de la secuencia de aminoácidos del "esqueleto principal" de la SEQ ID NO: 172 usando métodos de evolución dirigida según se describió anteriormente junto con el ensayo de HTP y los métodos analíticos que se describen a continuación en la Tabla 16-1.

[0199] Se inició la evolución dirigida con el polinucleótido que se establece en la SEQ ID NO: 171. Luego de eso, se seleccionaron polipéptidos modificados como secuencias génicas del "esqueleto principal" de partida. Se generaron bibliotecas de polipéptidos modificados utilizando diversas técnicas bien conocidas (por ejemplo, mutagénesis por saturación, recombinación de diferencias de aminoácidos beneficiosas identificadas previamente) y se seleccionaron utilizando métodos de ensayo y análisis de HTP con los que se midió la capacidad de los polipéptidos de convertir los sustratos iso- α -ácidos en el producto dihidro-(rho)-iso- α -ácido que se deseaba.

[0200] El ensayo enzimático se llevó a cabo en un formato de placas de 96 pocillos profundos, en un volumen total de 100 μ l/pocillo, que incluía lisado enzimático de HTP al 20 % v/v, solución acuosa al 40 % v/v de sustrato de iso- α -ácido (solución de extracto de lúpulo isomerizado Isolone®, de Kalsec) y 0,02 g/l de NADP en isopropanol (IPA) al 40% en volumen en fosfato de potasio 100 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM. Se sellaron las placas y se incubaron a 45 °C con agitación a 600 rpm durante 20-24 horas.

[0201] Después de 20-24 horas, se agregaron 1000 μ l de acetonitrilo con ácido acético al 0,1 %. Se sellaron las placas y centrifugaron a 4.000 rpm a 4 °C durante 10 min. La muestra inactivada se diluyó adicionalmente 4-5x en una mezcla de acetonitrilo:agua 50:50 antes de realizar el análisis por HPLC. Los parámetros de la corrida de HPLC se dan a continuación en la Tabla 5-2.

Tabla 16-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 172		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 172)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 172)¹
177/178	E204Q	+
179/180	I226V	+
181/182	D101Y	+

Tabla 16-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 172		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 172)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 172)¹
183/184	Y179M	+
185/186	D101R	++
187/188	A231G	+
189/190	P194E	+
191/192	E45L	+
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 172 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,0 pero < 1,5, "++" ≥ 1,5		

EJEMPLO 17

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de la SEQ ID NO: 186 para mejorar la actividad KRED sobre trans-ISO

[0202] Se seleccionó a la SEQ ID NO: 186 como la enzima original en base a los resultados de la selección de variantes para la reducción del sustrato iso- α -ácido. Se produjeron bibliotecas de genes modificados usando técnicas bien establecidas (por ejemplo, mutagénesis de saturación y recombinación de mutaciones beneficiosas identificadas previamente). Los polipéptidos codificados por cada gen se produjeron en HTP como se describe en el Ejemplo 2, y se generó el lisado soluble como se describe en el Ejemplo 3.

[0203] Se utilizó el polinucleótido modificado que codifica el polipéptido con actividad KRED de la SEQ ID NO: 185 para generar los polipéptidos modificados adicionales de la Tabla 17-2. Estos polipéptidos mostraron una formación mejorada de dihidro-(rho)-iso- α -ácidos a partir de iso- α -ácidos en comparación con el polipéptido de partida. Se generaron los polipéptidos modificados a partir de la secuencia de aminoácidos del "esqueleto principal" de la SEQ ID NO: 186 usando métodos de evolución dirigida según se describió anteriormente junto con el ensayo de HTP y los métodos analíticos que se describen en la Tabla 5-2.

[0204] Se inició la evolución dirigida con el polinucleótido que se establece en la SEQ ID NO: 185. Luego de eso, se seleccionaron polipéptidos modificados como secuencias génicas del "esqueleto principal" de partida. Se generaron bibliotecas de polipéptidos modificados utilizando diversas técnicas bien conocidas (por ejemplo, mutagénesis por saturación, recombinación de diferencias de aminoácidos beneficiosas identificadas previamente) y se seleccionaron utilizando métodos de ensayo y análisis de HTP con los que se midió la capacidad de los polipéptidos de convertir los sustratos iso- α -ácidos en el producto dihidro-(rho)-iso- α -ácido que se deseaba.

[0205] El ensayo enzimático se llevó a cabo en un formato de placas de 96 pocillos profundos, en 100 μ l de volumen total/pocillo, que incluía 50 % v/v de lisado enzimático de HTP, 10 % v/v de 10 g/l de la SEQ ID NO: 186, 1 g/l de sustrato iso- α -ácido (solución de extracto de lúpulo isomerizado Isolone® de Kalsec) y 0,1 g/l de NADP en isopropanol (IPA) al 40% en volumen en fosfato de potasio 100 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM. Se sellaron las placas y se incubaron a 30 °C con agitación a 600 rpm durante 44-48 horas.

[0206] Después de 20-24 horas, se agregaron 1000 μ l de acetonitrilo con ácido acético al 0,1 %. Se sellaron las placas y centrifugaron a 4.000 rpm a 4 °C durante 10 min. La muestra inactivada se diluyó adicionalmente 4-5x en una mezcla de acetonitrilo:agua 50:50 antes de realizar el análisis por HPLC. Los parámetros de la corrida de HPLC se describen a continuación en la Tabla 17-1. Véase la Figura 3. En la Tabla 17-2 se muestran las variantes que mostraron una actividad mejorada hacia los Trans-ISO.

Tabla 17-1. Parámetros de la HPLC			
Instrumento	Agilent 1100 HPLC		
Columna	Columna Waters Atlantis T3 3 x 150 mm 2,1 μ m		
Fase móvil	Acetonitrilo al 30% en fosfato de potasio 50 mM a pH 8		
Caudal	0,8 ml/min		
Tiempo de la corrida	20 min		
Tiempos de retención de los picos	<u>Tiempo de retención del comp. [min]</u>		<u>nota.</u>
	Rho-1	3,4	trans-co-Rho
	Rho-2	4,8	cis-co-Rho

Tabla 17-1. Parámetros de la HPLC			
	Rho-3	5,4	trans-n/ad-Rho
	Rho-4	7,0	mezcla de isómeros Rho
	Rho-5	7,3	mezcla de isómeros Rho
	Rho-6	7,7	cis-n/ad-Rho
	ISO-1	9,0	cis-co-ISO
	ISO-2	10,2	trans-co-ISO
	Rho-7	12,5	trans-n/ad-Rho
	ISO-3	15,1	cis-n/ad-ISO
	ISO-4	17,4	trans-n/ad-ISO
Temperatura de la columna	40 °C		
Volumen de inyección	10 µl		
Detección	270 nm		

Tabla 17-2. Actividad de la variante de KRED con relación a la actividad sobre trans-ISO mejorada		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 186)	Actividad sobre Trans-ISO 1
193/194	D150A/L153A/M205A/L211A	+
195/196	D150A/L153A/L211A	+
197/198	V95A/K97A/D150A/L153A	+
199/200	V95A/D150A/L153A/M205A/L211A	+
201/202	K97A/D150A/L153A	+
203/204	M145A/L153A/L211A	+
205/206	I96A/D150A/L153A	+

Tabla 17-2. Actividad de la variante de KRED con relación a la actividad sobre trans-ISO mejorada		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 186)	Actividad sobre Trans-ISO 1
207/208	K97A/D150A/L153A/M205A/L211A	+
209/210	V95A/D150A/L153A/M205A/M206A/L211A	+
211/212	K97A/D150A/L153A/M205A	+
213/214	D150A/L153A/M206A/L211A	+
215/216	D150A/L153A/M206A/L211A	+
217/218	V95A/I96A/K97A/D150A/L153A/M205A	+
219/220	V95A/K97A/S143A/M145A/D150A/L153A/W202A/M205A	+
221/222	K97A/D150A/L153A/M206A	+
223/224	V95A/K97A/D150A/L153A/W202A/M205A/M206A	+
225/226	S143A/I144A/M145A/D150A/L153A/W202A/M205A/W249A	+
227/228	S143A/M145A/D150A/L153A	+
229/230	V95A/K97A/S143A/M145A/D150A/L153A/W249A	+
231/232	I96A/D150A/L153A/M206A	+
233/234	I144A/D150A/L153A/W202A/M205A/M206A	+
235/236	V95A/I96A/D150A/L153A/M205A/M206A/L211A/W249A	+
237/238	V95A/D150A/L153A/M206A/W249A	+
239/240	I144A/M145A/D150A/L153A/M205A/M206A	+
241/242	M145A/D150A/L153A/M206A/W249A	+

Tabla 17-2. Actividad de la variante de KRED con relación a la actividad sobre trans-ISO mejorada		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 186)	Actividad sobre Trans-ISO ¹
243/244	D150A/L153A/W249A	+
245/246	I144A/D150A/L153A	+
247/248	D150A/L153A/W202A/M206A/W249A	+
249/250	V95A/D150A/L153A/M206A/W249A	+
¹ La SEQ ID NO: 186 no mostró actividad detectable sobre trans-ISO		

EJEMPLO 18

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de la SEQ ID NO: 186 para mejorar la actividad KRED

[0207] Se produjeron bibliotecas de genes modificados utilizando técnicas bien establecidas (por ejemplo, mutagénesis de saturación y recombinación de mutaciones beneficiosas identificadas previamente), tal como se describe en el Ejemplo 16. Los polipéptidos codificados por cada gen se produjeron en HTP como se describe en el Ejemplo 2, y se generó el lisado soluble como se describe en el Ejemplo 3.

[0208] Se utilizó el polinucleótido modificado que codifica el polipéptido con actividad KRED de la SEQ ID NO: 186 (es decir, la SEQ ID NO: 185) para generar los polipéptidos modificados mejorados adicionales de la Tabla 18-1.

Tabla 18-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 186		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: SEQ ID NO: 186)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 186) ¹

Tabla 18-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 186		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: SEQ ID NO: 186)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 186) ¹
251/252	I110V/Y179M/P194E	++
253/254	I110V	++
255/256	T103R/L147I	++
257/258	I110V	++
259/260	H7Q/L147I	+
261/262	W249Y	+
263/264	L147I	+
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 186 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,2 pero < 1,5, "++" ≥ 1,5		

EJEMPLO 19

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de las SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 252 para mejorar la actividad KRED a altas concentraciones de sustrato y bajas concentraciones de NADP

[0209] Se preparó una solución madre de la enzima de 200 g/l disolviendo 100 mg de enzima en polvo en 500 µl de regulador de pH de fosfato de potasio 100 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM y 0,1 g/l de NADP. A un pocillo en una placa de 96 pocillos profundos se le agregaron una alícuota de 40 µl de la solución madre de la enzima/NADP, 80 µl de isopropanol y 80 µl de una solución acuosa al 40% en peso de iso-α-ácidos. La composición final de la solución de reacción fue: 40 g/l de enzima, 160 g/l de iso-α-ácidos y 0,02 g/l de NADP en IPA al 40%. Se selló la placa y se incubó a 40 °C durante 24 horas y luego se inactivó y se analizó por HPLC-UV. En las Tablas 19-1, 19-2 y 19-3 se muestran los datos.

Tabla 19-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 194

SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 194)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (SEQ ID NO: 194) ¹
265/266	V12I/K72S/I110V/L147I/T152M/E204Q	++
267/268	V12I/K72S/R101Y/T103Q/I110V/T152M/W249Y	++
269/270	E45L/T54S/K72S/I110V/T152M/P194E/E204Q	++
271/272	V12I/T54S/K72T/I110V/A150D/T152M/A153L/P194E/A205M/A211L/W249Y	++
273/274	I110V/A150D/A153L/Y179M/P194E/A205M/A211L/W249Y	+
275/276	H7Q/V12I/T54S/I110V/A150D/A153L/P194E/A205M/A211L/W249Y	+
277/278	K72S/I110V/L147M/A150D/T152M/A153L/P194E/A205M/A211L/W249Y	+
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 194 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,2 pero < 1,5, "++" ≥ 1,5		

Tabla 19-2. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 252		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 252)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 252) ¹
277/278	K72S/L147M/T152M/M179Y/W249Y	+++
275/276	H7Q/V12I/T54S/M179Y/W249Y	+++
271/272	V12I/T54S/K72T/T152M/M179Y/W249Y	++++
273/274	W249Y	++
279/280	H40E	+

Tabla 19-2. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 252		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 252)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 252) ¹
281/282	T54S/K72S	+
283/284	H7Q/T152M	++
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 252 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,2 pero < 1,5, "++" > 1,5, "+++" > 1,5 pero < 2,0, "++++" > 2,0		

Tabla 19-3. Actividad KRED en alta concentración de sustrato y baja concentración de NADPH						
SEQ ID NO: (nt/aa)	% de Conversión					
	40 g/l	20 g/l	10 g/l	5 g/l	2,5 g/l	1,25 g/l
193/194	43	26	17	7	2	1
251/252	42	30	23	12	5	1
269/270	47	30	22	11	5	2
271/272	48	33	31	25	14	7

EJEMPLO 20

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de la SEQ ID NO: 270 y SEQ ID NO: 272 para mejorar la actividad KRED a altas concentraciones de sustrato y bajas concentraciones de NADP

[0210] Se produjeron bibliotecas de genes modificados utilizando técnicas bien establecidas (por ejemplo, mutagénesis de saturación y recombinación de mutaciones beneficiosas identificadas previamente) tal como se describe en el Ejemplo 18. Los polipéptidos codificados por cada gen se produjeron en HTP como se describe en el Ejemplo 2, y se generó el lisado soluble como se describe en el Ejemplo 3.

[0211] Se usaron los polinucleótidos modificados que codifican los polipéptidos que tienen actividad KRED de la SEQ ID NO: 270 (es decir, la SEQ ID NO: 269) y NO: 272 (es decir,

la SEQ ID NO: 271) para generar los polipéptidos modificados mejorados de las Tablas 20-1 y 20-2.

Tabla 20-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 270		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 270)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 270) ¹
285/286	A150Y/M152A	++
287/288	A150Y/M152S	++
289/290	E194S/R195A	+
291/292	G92A/I93E	+
293/294	A150D/M152A/A153L	+
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 270 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,2 pero < 1,5, "++" ≥ 1,5		

Tabla 20-2. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 272		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 272)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 272) ¹
295/296	I93D/V95R	+++
297/298	I93A/V95K/K109R	++++
299/300	I93A/V95R/K109D/N114T	++++
301/302	I93R/V95A/N114T	+++
303/304	I93M	++
305/306	I93E/K109R/N114A	++

Tabla 20-2. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 272		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 272)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 272) ¹
307/308	N114A	+
309/310	G92A/I93D/V95R	++
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 272 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,2 pero < 1,5, "++" > 1,5, "+++" > 1,5 pero < 2,0, "++++" > 2,0		

EJEMPLO 21

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de la SEQ ID NO: 286 para mejorar la actividad KRED a altas concentraciones de sustrato y bajas concentraciones de NADP

[0212] Se produjeron bibliotecas de genes modificados utilizando técnicas bien establecidas (por ejemplo, mutagénesis de saturación y recombinación de mutaciones beneficiosas identificadas previamente) tal como se describe en el Ejemplo 18. Los polipéptidos codificados por cada gen se produjeron en HTP como se describe en el Ejemplo 2, y se generó el lisado soluble como se describe en el Ejemplo 3.

[0213] El polinucleótido modificado que codifica el polipéptido con actividad KRED de la SEQ ID NO: 286 (es decir, la SEQ ID NO: 285) se utilizó para generar los polipéptidos modificados mejorados adicionales de la Tabla 21-1.

Tabla 21-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 286		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 286)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 286) ¹
311/312	I96A	+
313/314	M145A/Y150A	+

Tabla 21-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 286		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 286)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 286) ¹
315/316	V12I/L45E/W249Y	++
317/318	L45E/W249Y	++
319/320	L45E/K109D/W249Y	+++
321/322	L45E/S72T/W249Y	++
323/324	V12I/L45E/I93A/W249Y	++
325/326	V12I/K109D/W249Y	++
327/328	V12I/L45E/S72T/K109D/W249Y	+++
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 286 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,2 pero < 1,5, "++" > 1,5, "+++" > 1,5 pero < 2,0, "++++" > 2,0		

EJEMPLO 22

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de la SEQ ID NO: 328 para mejorar la actividad KRED

[0214] Se seleccionó a la SEQ ID NO: 328 como la enzima original en base a los resultados de la selección de variantes para la reducción del sustrato iso- α -ácido. Se produjeron bibliotecas de genes modificados usando técnicas bien establecidas (por ejemplo, mutagénesis de saturación y recombinación de mutaciones beneficiosas identificadas previamente). Los polipéptidos codificados por cada gen se produjeron en HTP como se describe en el Ejemplo 2, y se generó el lisado soluble como se describe en el Ejemplo 3.

[0215] Se utilizó el polinucleótido modificado que codifica el polipéptido con actividad KRED de la SEQ ID NO: 327 para generar los polipéptidos modificados adicionales de la Tabla 22-1. Estos polipéptidos mostraron una formación mejorada de dihidro-(rho)-iso- α -ácidos a partir de iso- α -ácidos en comparación con el polipéptido de partida. Se generaron los polipéptidos modificados a partir de la secuencia de aminoácidos del "esqueleto principal" de

la SEQ ID NO: 328 usando métodos de evolución dirigida según se describió anteriormente junto con el ensayo de HTP y los métodos analíticos que se describen en la Tabla 5-2.

[0216] Se inició la evolución dirigida con el polinucleótido que se establece en la SEQ ID NO: 327. Luego de eso, se seleccionaron polipéptidos modificados como secuencias génicas del "esqueleto principal" de partida. Se generaron bibliotecas de polipéptidos modificados utilizando diversas técnicas bien conocidas (por ejemplo, mutagénesis por saturación, recombinación de diferencias de aminoácidos beneficiosas identificadas previamente) y se seleccionaron utilizando métodos de ensayo y análisis de HTP con los que se midió la capacidad de los polipéptidos de convertir los sustratos iso- α -ácidos en el producto dihidro-(rho)-iso- α -ácido que se deseaba.

[0217] El ensayo enzimático se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo, en un volumen total de 200 μ l/pocillo, que incluía 20 % v/v de lisado enzimático de HTP, 40 % v/v de solución acuosa al 40 % en peso de sustrato de iso- α -ácido (solución de extracto de lúpulo isomerizado Isolone®, de Kalsec) y 0,02 g/l de NADP en isopropanol (IPA) al 40% en volumen en fosfato de potasio 100 mM a pH 8 con MgSO₄ 2 mM. Se sellaron las placas y se incubaron a 45 °C con agitación a 600 rpm durante 20-24 horas.

[0218] Después de 20-24 horas, se agregaron 1000 μ l de acetonitrilo con ácido acético al 0,1 %. Se sellaron las placas y centrifugaron a 4.000 rpm a 4 °C durante 10 min. La muestra inactivada se diluyó adicionalmente 4-5x en una mezcla de acetonitrilo:agua 50:50 antes de realizar el análisis por HPLC. Los parámetros de la corrida de HPLC se describen en la Tabla 5-2 y en la Tabla 17-1. En la Tabla 22-1 se muestran las variantes mejoradas.

Tabla 22-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 328		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 328)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 328) ¹
329/330	Y150A/R195S	+++
331/332	Y150A	+++
333/334	R195S	++
335/336	R195A	+

Tabla 22-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 328		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 328)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 328) ¹
337/338	R195S	+
339/340	Y150A/P151A	+
341/342	Y150A/R195S	+
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de las SEQ ID NO: 328 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,2 pero < 1,5, "++" > 1,5, "+++" > 1,5 pero < 2,0, "++++" > 2,0		

EJEMPLO 23

Rendimiento de las SEQ ID NO: 328 y SEQ ID NO: 330 con altas cargas de sustrato y bajas cargas de NADP

[0219] Se disolvió una muestra de 8 g de solución ISO acuosa al 40 % en peso en 8 ml de isopropanol (IPA) y 2 ml de regulador de pH de fosfato de potasio 100 mM a pH 8. El pH se ajustó a 8 con NaOH 4 N y/o H₃PO₄ al 10%. Se agregaron 4,5 ml de la solución ISO/IPA/regulador de pH con el pH ajustado a unos viales tapados con septos que tenían una barra de agitador y bajo una manta de nitrógeno en un bloque calefactor a 40 °C. A las soluciones se les agregaron 0,5 ml de 10 o 40 g/l de KRED en regulador de pH de fosfato de potasio 100 mM a pH 8 con MgSO₄ 10 mM y 0,2 g/l de NADP (las cargas finales de KRED y NADP son de 1 o 4 g/l KRED y 0,02 g/l de NADP respectivamente). A diversos intervalos de tiempo, se retiraron alícuotas de 20 µl de la reacción a través de una jeringa, se extinguieron con 1000 µl de acetonitrilo/agua 1:1 con ácido acético al 0,1 %. Después de centrifugar a 4.000 rpm a 20 °C durante 5 min, se diluyeron 20 µl de los sobrenadantes con 180 µl de acetonitrilo/agua 1:1 con ácido acético al 0,1 % para los análisis por HPLC (Tabla 5-2 y Tabla 17-1). Véase la Figura 4.

EJEMPLO 24

Evolución y selección de polipéptidos modificados derivados de la SEQ ID NO: 330 para mejorar la actividad KRED

[0220] Se seleccionó la SEQ ID NO: 330 como la enzima original en base a los resultados de la selección de variantes para la reducción del sustrato iso- α -ácido. Se produjeron bibliotecas de genes modificados usando técnicas bien establecidas (por ejemplo, mutagénesis de saturación y recombinación de mutaciones beneficiosas identificadas previamente). Los polipéptidos codificados por cada gen se produjeron en HTP como se describe en el Ejemplo 2, y se generó el lisado soluble como se describe en el Ejemplo 3.

[0221] Se utilizó el polinucleótido modificado que codifica el polipéptido con actividad KRED de la SEQ ID NO: 329 para generar los polipéptidos modificados adicionales de la Tabla 24-1. Estos polipéptidos mostraron una formación mejorada de dihidro-(rho)-iso- α -ácidos a partir de iso- α -ácidos en comparación con el polipéptido de partida. Se generaron los polipéptidos modificados a partir de la secuencia de aminoácidos del "esqueleto principal" de la SEQ ID NO: 330 usando métodos de evolución dirigida según se describió anteriormente junto con el ensayo de HTP y los métodos analíticos que se describen a continuación en la Tabla 24-1.

[0222] Se inició la evolución dirigida con el polinucleótido que se establece en la SEQ ID NO: 329. Luego de eso, se seleccionaron polipéptidos modificados como secuencias génicas del "esqueleto principal" de partida. Se generaron bibliotecas de polipéptidos modificados utilizando diversas técnicas bien conocidas (por ejemplo, mutagénesis por saturación, recombinación de diferencias de aminoácidos beneficiosas identificadas previamente) y se seleccionaron utilizando métodos de ensayo y análisis de HTP con los que se midió la capacidad de los polipéptidos de convertir los sustratos iso- α -ácidos en el producto dihidro-(rho)-iso- α -ácido que se deseaba.

[0223] El ensayo enzimático se llevó a cabo en un formato de placas de 96 pocillos de fondo redondo, en un volumen total/pocillo de 200 μ l, que incluía lisado enzimático de HTP al 50 % v/v, solución acuosa al 40 % en peso de sustrato de iso- α -ácido (solución de extracto de lúpulo isomerizado Isolone®, de Kalsec), y 0,02 g/l de NADP en isopropanol (IPA) al 40% en volumen en fosfato potásico 100 mM a pH 8 con MgSO_4 2 mM. Se sellaron las placas y se incubaron a 45 °C con agitación a 600 rpm durante 20-24 horas.

Tabla 24-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 330
--

SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 330)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 330) ¹
343/344	V95R/S195R	++
345/346	I93A/S195R	++
347/348	I93A/V95R/M145A/S195R	+
349/350	I93A/D109K/N114T/M145A/S195R	++
351/352	M145A/S195A	+
353/354	S195R	+
355/356	T72K/A152M/S195R	++
357/358	I12V/T72S/D109K/S195R	++
359/360	T72S/D109K/A152M/S195R	++
361/362	T72S/D109K/S195R	++
363/364	T72K/S195R	+
365/366	I93A	+
367/368	E194N	+
369/370	E194N/E200P	+
371/372	E200P	+
373/374	E79A	+
375/376	I96P/E194N/E200P	+
377/378	I96P/R108S/L147I/E200P	+
379/380	K192R	+
381/382	L147I	+
383/384	L147I/E200P	+

Tabla 24-1. Actividad de la variante de KRED con relación a la SEQ ID NO: 330		
SEQ ID NO: (nt/aa)	Diferencias de aminoácidos (Con relación a la SEQ ID NO: 330)	Mejora en veces del porcentaje de conversión (Con relación a la SEQ ID NO: 330) ¹
385/386	L73V	+
387/388	L73V/L147I	+
389/390	M17A/L115Q	+
391/392	M17A/L73V/E200P	+
393/394	Q198G	+
395/396	Q198R	+
397/398	A68R/T72D/R101Q/A152Q/A205L	+
399/400	A68E/T72D/R101K/A152Q/A205L	+
401/402	R101M/A205L	+
403/404	A68R/T72R/L124E	+
405/406	A68R/T72R/L124E/A152Q	+
407/408	T72D/A152Q	+
409/410	A68R/L124E/A205L	+
411/412	A68R/R101Q/L124E/A152Q/A205L	+
¹ Se determinaron los niveles de aumento de la actividad con relación al polipéptido de referencia de la SEQ ID NO: 330 y se definieron de la siguiente manera: "+" > 1,2 pero < 1,5, "++" > 1,5, "+++" > 1,5 pero < 2,0, "++++" > 2,0		

EJEMPLO 25

Rendimiento de las SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 348, SEQ ID NO: 346 y SEQ ID NO: 356 con altas cargas de sustrato y bajas cargas de NADP

[0224] Se disolvió una muestra de 80 mg de cada variante en 1 ml de solución madre de NADP preparada con 10 mg de NADP en 100 ml de fosfato de potasio 100 mM, pH 9 y MgSO_4 10 mM. Se hicieron 5 diluciones 1:1 sucesivas de la solución madre para obtener soluciones madre de 80, 40, 20, 10 y 5 g/l de enzima en solución madre de NADP. Se agregó una alícuota de 20 μl de la solución madre a 40 μl de solución ISO al 40 % en peso y 40 μl de IPA en una placa con pocillos de fondo redondo para obtener una composición final de 160 g/l de ISO en 40 % en volumen de IPA en fosfato de potasio 20 mM a pH 8 y MgSO_4 2 mM con 0,02 g/l de NADP. Las concentraciones finales de enzima fueron 16, 8, 4, 2 y 1 g/l respectivamente. Se sellaron las placas y se colocaron en un agitador a 40° y a 600 rpm durante 24 horas. Luego de 24 horas, se centrifugaron las placas a 4.000 rpm a 20 °C durante 10 minutos y se transfirieron 100 μl del sobrenadante a 1 ml de acetonitrilo/agua 1:1 con ácido acético al 0,1 % en una placa de pocillos profundos. Se centrifugaron las placas de pocillos profundos con la mezcla de reacción extinguida a 4.000 rpm a 20 °C durante 10 minutos y se transfirieron 5 μl del sobrenadante a 200 μl de acetonitrilo/agua 1:1 con ácido acético al 0,1 % para los análisis por HPLC de acuerdo con la Tabla 5-2 y 17-1. Véase la Figura 5.

[0225] Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente y otros documentos que se citan en la presente Solicitud se incorporan aquí por referencia en toda su extensión para todos los fines en la misma medida que si se indicase individualmente que cada publicación, patente, solicitud de patente u otro documento individual se incorpora por referencia para todos los efectos.

[0226] Aunque se han ilustrado y descrito diversas formas de realización específicas, se apreciará que se pueden realizar diversos cambios sin apartarse del espíritu y alcance de la(s) invención(es).