



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 340 967**

51 Int. Cl.:
C12P 17/10 (2006.01)
C12P 19/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07803071 .5**
96 Fecha de presentación : **30.08.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2061892**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.05.2009**

54 Título: **Procedimiento quimioenzimático para la preparación de iminoclitoles.**

30 Prioridad: **01.09.2006 ES 200602274**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.06.2010

73 Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Bioglane, S.L.N.E.

72 Inventor/es: **Clapés Saborit, Pere;**
Joglar Tamargo, Jesús;
Castillo Expósito, José Antonio y
Lozano Pérez, Carles

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 340 967 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento quimioenzimático para la preparación de iminociclitolos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento quimioenzimático para la preparación de iminociclitolos. Los productos sintetizados se pueden usar como complementos dietéticos e ingredientes funcionales en la industria alimenticia, así como agentes terapéuticos (p. ej., en el tratamiento de diabetes).

10 **Estado de la técnica**

Los compuestos polihidroxilados, tales como oligosacáridos, carbohidratos complejos y sus conjugados con lípidos y proteínas, son moléculas de gran importancia en procesos bioquímicos de reconocimiento biológico tales como adhesión celular, infecciones virales, diferenciación celular en el desarrollo de órganos y metástasis (Koeller, K. M., Wong, C. H., *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 835). En consecuencia, las enzimas implicadas en su síntesis o degradación, glicosiltransferasas y glicosidasas, respectivamente, constituyen dianas de inhibición o de activación (según Kolter, T., Wendeler, M., *Chembiochem* 4 (2003) 260) dada su implicación en alteraciones metabólicas y en enfermedades tales como diabetes tipo II, hepatitis B y C, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, fibrosis cística, cáncer de colon o infecciones virales incluido el VIH (Asano, N., *J. Enzyme Inhib.* 15 (2000) 215; Asano, N., *Glycobiology* 13 (2003) 93R; Fiaux, H., Popowycz, F., Favre, S., Schutz, C., Vogel, P., Gerber-Lemaire, S., Juillerat-Jeanneret, L., *J. Med. Chem.* 48 (2005) 4237).

De entre los compuestos polihidroxilados inhibidores de glicosiltransferasas y glicosidasas destacan los iminociclitotos tipo piperidinas, piperidinas, indolizidinas, piperidinas, nortropanos e iminociclitotos polihidroxilados de siete miembros, entre otros, algunos de los cuales son potentes inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas (Asano, N., *J. Enzyme Inhib.* 15 (2000) 215; Asano, N., *Glycobiology* 13 (2003) 93R; Lillelund, V. H., Jensen, H. H., Liang, X., Bols, M., *Chem. Rev.* 102 (2002) 515; Compain, P., Martin, O. R., *Curr. Top. Med. Chem.* 3 (2003) 541; Mehta, G., Lakshminath, S., *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 331; Moris-Varas, F., Qian, X.-H., Wong, C.-H., *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 7647; Fuentes, J., Olano, D., Pradera, M. A., *Tetrahedron Lett.* 40 (1999) 4063; Li, H. Q., Blieriot, Y., Chante-reau, C., Mallet, J. M., Sollogoub, M., Zhang, Y. M., Rodriguez-García, E., Vogel, P., Jimenez Barbero, J., Sinay, P., *Org. Biomol. Chem.* 2 (2004) 1492; Lin, C. C., Pan, Y. S., Patkar, L. N., Lin, H. M., Tzou, D. L. M., Subramanian, T., *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 3259; Godin, G., Garnier, E., Compain, P., Martin, O. R., Ikeda, K., Asano, N., *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 579).

Algunos derivados como el miglitol y el miglustat son fármacos que se comercializan para el tratamiento de la diabetes tipo II (Platt, F. M., Butters, T. D., *Drugs* 63 (2003) 2435).

Se han descrito algunos iminociclitotos naturales o extractos vegetales que contienen iminociclitotos como ingredientes funcionales en la industria alimenticia o como complementos dietéticos. Así, US20010018090 describe el uso de la 1-deoxinojirimicina o un análogo de la misma como agente reductor de calorías que se puede incorporar a un alimento o bebida; US20060222720 describe un agente anoréctico que contiene, como ingredientes activos, extractos de disolvente acuosos de Vernonia cinerea y moras; WO2004037001 describe la adición de extractos de moras a un alimento que contiene sacáridos para regular los niveles de azúcar en sangre.

Las estrategias quimio-enzimáticas descritas hasta el momento para la síntesis de iminociclitotos se basan en la utilización de aldolasas, enzimas capaces de catalizar reacciones de condensación aldólica estereoselectivas entre aldehidos y cetonas (Von der Osten, C. H., Sinskey, A. J., Barbas, C. F., III, Pederson, R. L., Wang, Y. F., Wong, C. H., *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 3924, Romero, A., Wong, C. H., *J. Org. Chem.* 65 (2000) 8264, Look, G. C., Fotsch, C. H., Wong, C. H., *Acc. Chem. Res.* 26 (1993) 182, Machajewski, T. D., Wong, C. H., *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 1353; Patente (US005329052A)). De entre las aldolasas conocidas, las dependientes de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) han centrado la atención por cuatro razones:

- 1) su accesibilidad, algunas de ellas son comerciales o de producción relativamente simple a partir de *E. coli* modificado,
- 2) su elevada estereoselectividad,
- 3) su amplia tolerancia estructural por el aldehido aceptor, y
- 4) su capacidad estereogénica.

Las aldolasas dependientes de DHAP (DHAP aldolasas) catalizan la adición aldólica reversible de DHAP a un aldehido aceptor, generándose α,β -dihidroxiacetonas con dos nuevos centros estereogénicos. Particularmente interesante es que se conocen las cuatro DHAP aldolasas estereocomplementarias (Figura 1): *D*-fructosa-1,6-difosfato aldolasa (FruA), *L*-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA); *L*-fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) y *D*-tagatosa-1,6-difosfato aldolasa (TagA). Ventajosamente, estos biocatalizadores tienen cierta capacidad de controlar la estereoquímica de la

adición aldólica, dependiendo de la configuración de los nuevos centros estereogénicos creados de la enzima y no de los reactivos de la adición aldólica.

5 El esquema sintético quimio-enzimático general para la síntesis de iminociclitolos empleando DHAP-aldolasas se muestra en la Figura 2. El paso crucial en este esquema es la adición aldólica de la DHAP a aminoaldehidos o sus equivalentes sintéticos catalizada por DHAP aldolasas. En esta etapa se generan dos centros estereogénicos cuya configuración depende de la enzima, aunque existen numerosos ejemplos en los que, en función del sustrato, la enzima pierde selectividad generándose productos diastereoméricos. La siguiente etapa es la hidrólisis de la porción fosfato del aducto aldol mediante una fosfatasa ácida. Finalmente, la eliminación de Cbz y la transformación al iminociclitol se realiza generalmente en una etapa.

15 Una etapa crucial en esta síntesis es la preparación de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). La síntesis química de la dihidroxiacetona fosfato se realiza en cinco etapas con rendimientos globales alrededor del 60% (Figura 3) según lo descrito por Jung *et al.* (Jung, S.-H., Jeong, J.-H., Miller, P., Wong, C.-H., *J. Org. Chem.* 59 (1994) 7182).

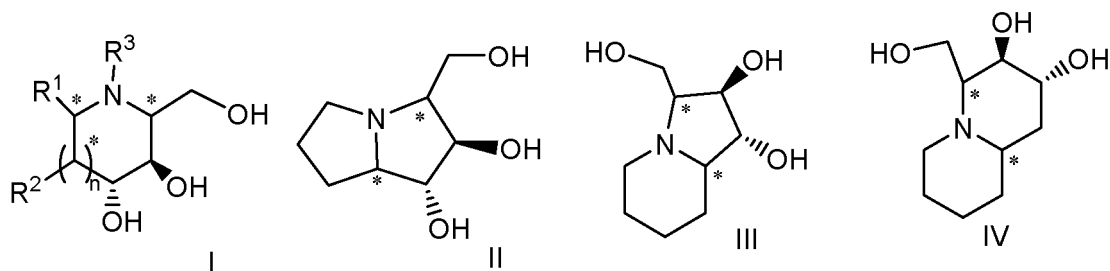
20 Una aproximación alternativa son los sistemas multienzimáticos para la generación "in situ" de DHAP. Se trata de procedimientos sofisticados que exigen un control muy estricto de las condiciones de reacción y la presencia en la mezcla de reacción de componentes que pueden dificultar el aislamiento y purificación del producto final (Fessner, W. D., Sinerius, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* 33 (1994) 209; Charmantray, F., El Blidi, L., Gefflaut, T., Hecquet, L., Bolte, J., Lemaire, M., *J. Org. Chem.* 69 (2004) 9310; Sanchez-Moreno, I., Francisco García-García, J., Bastida, A., García-Junceda, E., *Chem. Commun.* (2004) 1634).

25 En la patente (US005329052A) y como se describe en Von der Osten *et al.* (Von der Osten, C. H., Sinskey, A. J., Barbas, C. F., III, Pederson, R. L., Wang, Y. F., Wong, C. H., *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 3924), se utiliza dihidroxiacetona en presencia de sales de arsénico como sustituto de la DHAP para la adición aldólica enzimática. Si bien se simplifica el procedimiento, la utilización de sales de arsénico no es aplicable debido a su toxicidad y, por tanto, su peligrosidad para la salud y el medio ambiente.

30 Las síntesis quimioenzimáticas de iminociclitolos descritas hasta el momento emplean alrededor de 8 etapas a partir del aldehído aceptor: dos de ellas enzimáticas, adición aldólica de DHAP a aldehído e hidrólisis del éster fosfato; y 6 etapas químicas para la síntesis de DHAP y la formación de los correspondientes iminociclitolos. Si la reacción se realiza con sistemas multienzimáticos, ésta requiere de dos enzimas más: una para la formación del intermedio clave, DHAP, y otra para regenerar el reactivo de fosforilación enzimática. Por tanto son estrategias de muchos pasos o muy sofisticadas y, por tanto, de limitada aplicación industrial.

Resumen de la invención

40 Un objeto de la invención es un procedimiento quimioenzimático para la preparación de un iminociclitol de fórmula (I), (II), (III) o (IV):

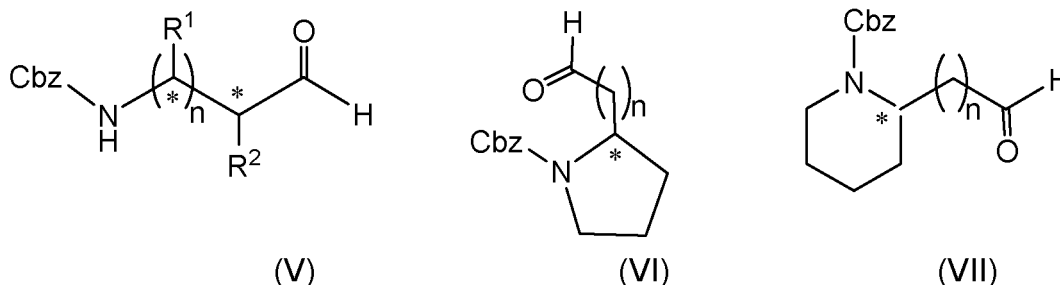


donde:

- 55
- R¹ y R² son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: H, OH, hidroximetil, metil, etil, butil, pentil, hexil, octil, isopropil, isobutil, 2-metilbutil, y bencil;
 - R³ se selecciona del grupo que consiste en: H, hidroximetil, hidroxietil, etil, butil, pentil, hexil, octil, dodecil, isobutil, isopropil, isopentil, 2-metilbutil, bencil, y feniletil;
- 60
- n: 0 ó 1;
 - las configuraciones de los átomos de carbono a los que se unen los sustituyentes R¹ y R² en el iminociclitol de fórmula I son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de R y S; y
- 65
- los centros estereogénicos (*) en el iminociclitol de fórmula II, III ó IV son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de R y S,

caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

i) adición aldólica entre la dihidroxiacetona (DHA) y un aminoaldehído aceptor, catalizada por una enzima D-fructosa-6-fosfato aldolasa, el aminoaldehído aceptor correspondiendo a la fórmula V, VI ó VII,



donde:

- R¹, R² y n son según se definen más arriba,
- las configuraciones de los átomos de carbono a los que se unen los sustituyentes R¹ y R² en la fórmula V y el centro estereogénico de las fórmulas VI y VII son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de R y S, y
- Cbz representa un grupo benciloxicarbonil;

y

ii) una aminación reductora intramolecular del aducto de adición obtenido en la etapa i) con H₂, en presencia de un catalizador metálico; llevándose a cabo dicha etapa (ii), opcionalmente, con un aldehído de fórmula R³-CHO, donde R³ es según se define más arriba, que resulta en una aminación reductora doble.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han observado que es posible la síntesis de iminociclitoles mediante un procedimiento basado en la utilización de la enzima D-fructosa-6-fosfato aldolasa, de aquí en adelante FSA, como catalizador biológico para la reacción de adición aldólica entre la dihidroxiacetona y un aminoaldehído de fórmula V, VI ó VII.

Es conocida la capacidad de la FSA de catalizar la adición aldólica entre la DHA y un glicolaldehído, D,L-gliceraldehído-3-fosfato, D-gliceraldehído y D-eritrosa (Schürmann, M.; Sprenger, G. A. *J. Biol. Chem.* (2001) 276 11055). Además, es conocido que el sitio activo de la FSA incluye un residuo de arginina que es esencial para la disposición satisfactoria de su sustrato natural y para dar lugar a la reacción enzimática. La naturaleza del sitio activo enzimático determina la naturaleza de los compuestos a ser usados como sustrato y de las enseñanzas de Schurman *et al.*, (*supra*) se puede concluir que los mejores sustratos aceptores son los aldehídos hidrofílicos descritos en ese documento.

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que aunque los aminoaldehídos de fórmula (V), (VI) y (VII) tienen propiedades físico-químicas bastante diferentes, siendo altamente hidrofóbicos en comparación con los sustratos conocidos en la técnica anterior, la adición aldólica se lleva a cabo de manera eficiente.

Además, en Schürmann *et al.*, (*supra*) no se caracterizaron totalmente los aductos de la adición aldólica producidos por la FSA mediante técnicas espectroscópicas ni se resolvió la estereoquímica de los aductos. Por lo tanto, no era posible deducir que los aminoaldehídos de fórmulas V, VI y VII eran sustratos de la FSA sustratos ni que la estereoquímica final de la reacción fuera adecuada para los productos de la presente invención.

Las siguientes son ventajas adicionales debidas al uso de la FSA:

- la FSA utiliza dihidroxiacetona (DHA) en la reacción de adición aldólica en lugar de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), ahorrando 5 etapas sintéticas en comparación con la metodología con aldolasas dependientes de DHAP, descritas más arriba,

ES 2 340 967 T3

- se elimina la etapa de hidrólisis enzimática del grupo fosfato mediante fosfatasa ácida y, por tanto, disminuyen las etapas sintéticas y los costes de producción,
- la obtención y purificación de la FSA es sencilla y de bajo coste,
- como biocatalizador la FSA es estable a 4°C durante al menos siete meses sin pérdida de actividad, y
- no utiliza ni genera residuos tóxicos. Como se ha mencionado más arriba, las DHAP-aldolasas pueden emplear DHA en presencia de sales de arsénico, producto altamente tóxico, peligroso para la salud y el medio ambiente.

Finalmente, otra ventaja de estos biocatalizadores es que tienen cierta capacidad de controlar la estereoquímica de la adición aldólica. De esta manera, la configuración de los nuevos centros estereogénicos creados depende de la enzima y no de los reactivos de la adición aldólica.

Por lo tanto, un objeto de la invención lo constituye un procedimiento quimioenzimático según se ha definido más arriba.

La eliminación del grupo protector de la amina y la aminación reductora intramolecular en esta etapa (ii) puede tener lugar en una reacción de tipo “*one-pot*”. Preferiblemente, tienen lugar en una reacción de tipo “*one-pot*”.

Una realización preferida es el procedimiento de la invención donde el iminociclitol es un iminociclitol de fórmula I que se selecciona del grupo que consiste en: miglitol; miglustat; D-fagomina, 1-deoxinojirimicina; derivados *N*-sustituidos de los mismos, como por ejemplo el *N*-butil-D-fagomina y el 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol. Preferiblemente, el iminociclitol se selecciona del grupo que consiste en: D-fagomina; 1-deoxinojirimicina; *N*-butil-D-fagomina; y 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol. Más preferiblemente, el iminociclitol se selecciona del grupo que consiste en: D-fagomina; 1-deoxinojirimicina; y *N*-butil-D-fagomina.

Otra realización preferida de la invención es el procedimiento en el que el aminoaldehído de la etapa (i) es un aminoaldehído protegido de tipo V que pertenece, a modo ilustrativo y no limitativo del ámbito de protección de la invención, al siguiente grupo: *N*-Cbz-3-aminopropanal, y (*S*)-*N*-Cbz-3-amino-2-hidroxiopropanal.

Una realización particular de la invención es el procedimiento de la invención donde la enzima FSA utilizada en la etapa i) se corresponde a la FSA de *E. coli* de SEC ID NO 2. La enzima D-fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA) utilizada en la presente invención ha sido clonada en la cepa *E. coli* MC4100, derivada de la cepa de *E. coli* K-12 (Schürmann, M.; Sprenger, G. A. *J. Biol. Chem.* (2001) 276 11055; Casadaban, M. J. (1976) *J. Mol. Biol.* 104, 541-555) y purificada posteriormente. Así, la enzima FSA preferida utilizada consiste en la forma salvaje que se encuentra de manera natural en dicho microorganismo y cuya secuencia de aminoácidos se corresponde con la SEC ID NO: 2. Se pueden aislar e identificar otras enzimas D-fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA) salvajes en otros microorganismos gracias a la información y procedimientos existentes en el estado de la técnica. Por lo tanto, otra realización de la presente invención es el procedimiento en el que la enzima FSA es una enzima de secuencia análoga a la SEC ID NO2, aislada de un microorganismo distinto de *E. coli*.

En el sentido utilizado en el presente documento, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser aislada de un microorganismo y que posea la capacidad de adición aldólica entre la dihidroxiacetona (DHA) y un aldehído aceptor de fórmula V, VI ó VII (Figura 4). En general, una secuencia de aminoácidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos indicada anteriormente. En el sentido utilizado en el presente documento, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de aminoácidos en cuestión tienen un grado de identidad de al menos un 30%, preferentemente de al menos un 85%, o más preferentemente de al menos un 95%.

Otro objeto particular de la invención es el procedimiento de la invención donde el catalizador metálico utilizado en la etapa ii) pertenece, a modo ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: Pd, Pt, Rh y combinaciones de Pd y cianoborohidruro sódico (NaCNBH₃).

Breve descripción de las figuras

Figura 1. - Estereoquímica de las DHAP aldolasas.

Figura 2.- Esquema general de la síntesis quimioenzimática de iminociclitoles. Nequiv: amina o azida protegida, tal como benciloxycarbonil-NH-, *tert*-butiloxycarbonil-NH-, 9-fluorenilmetoxycarbonil-NH-, fenilacetil-NH-, y azido. a) DHAP-aldolasa, b) fosfatasa ácida; c) aminación reductora intramolecular con H₂ en presencia de un catalizador metálico o de un agente reductor.

Figura 3.- Esquema de síntesis de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). a) HC(OEt)₃, H₂SO₄ cat., EtOH, b) Cl (O) P(OPh)₂, piridina anhidra, DMAP cat., c) H₂ 50 psi, PtO₂ cristalino, EtOH, d) H₂O, 65°C, e) NaOH acuoso hasta pH 7, f) Dowex H⁺, 65°C.

Figura 4.- Esquema de las reacciones que ejemplifican la utilización del procedimiento de la invención para la síntesis de D-fagomina, *N*-butil-D-fagomina y 1-deoxinojirimicina: a) FSA, b) Pd/C H₂ 50 psi de presión, y c) CH₃CH₂CH₂COH, Pd/C H₂ 50 psi de presión.

5

Ejemplos

A continuación se detallan cinco ejemplos de utilización de este procedimiento de preparación de D-fagomina, *N*-butil-D-fagomina, 1-deoxinojirimicina, y 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol (DAB). El esquema general de las reacciones que se detallan a continuación se muestra en la Figura 4.

Ejemplo 1

15 Síntesis de D-fagomina

Etapa 1)

20 Obtención del aducto de la adición aldólica

El aldehído de partida, *N*-Cbz-3-aminopropanal, se obtuvo a partir del 3-aminopropanol mediante procedimientos convencionales descritos por Espelt *et al.* (Espelt, L., Parella, T., Bujons, J., Solans, C., Joglar, J., Delgado, A., Clapés, P., *Chem.-Eur. J.* 9 (2003) 4887; Oejo, M., Vicario, J. L., Badía, D., Carrillo, L., Reyes, E., *Synlett* (2005) 2110).

25 En un reactor de 250 mL de capacidad y provisto de agitación orbital se disolvió el *N*-Cbz-3-aminopropanal (2.1 g, 22.9 mmol) en dimetilformamida (40 mL). A esta solución se añadió dihidroxiacetona (4.7 g, 22.9 mmol) y la enzima FSA en polvo crudo (2.09 g, 3445 U) disueltos en tampón bórico-borato 50 mM pH 7 (155 mL). La mezcla se dejó reaccionar bajo agitación orbital (120 rpm) a 4°C durante 24 horas. En este punto la conversión de la reacción fue mayor del 98%. A continuación, se añadió MeOH (200 mL) a la mezcla de reacción, apareciendo un precipitado que fue separado por centrifugación. El sobrenadante se purificó por cromatografía líquida de fase reversa. Se juntaron las fracciones puras, se evaporó el disolvente obteniendo 4,7 g de un sólido blanco (rendimiento: 69%, exceso diastereomérico 99%).

35 La obtención y purificación de la FSA se llevaron a cabo a partir del extracto crudo de proteína de la fermentación y ruptura celular mediante un tratamiento térmico a 75°C durante 40 minutos (Schurmann, M., Sprenger, G. A., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11055; Thorell, S., Schurmann, M., Sprenger, G. A., Schneider, G., *J. Mol. Biol.* 319 (2002) 161; Schurmann, M., Sprenger, G. A., *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 19 (2002) 247). El extracto de proteínas se obtuvo de la cepa *E. coli* MC4100, derivada de la cepa de *E. coli* K-12 (Casadaban, M. J. *J. Mol. Biol.* (1976) 104, 541), que comprende la secuencia codificante de la proteína FSA de *E. coli* (SEC ID NO: 1). La clonación, ligación a un plásmido y transformación en una cepa de *E. Coli* se describe detalladamente en Schurmann, M., Sprenger, G. A., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11055; La proteína FSA así obtenida (SEC ID NO: 2) conserva su actividad mientras que las impurezas proteicas precipitan separándose por simple filtración o centrifugación.

45 Etapa 2)

Desprotección y aminación reductora intramolecular

50 El aducto obtenido en la última etapa (373 mg, 1.26 mmol) se disolvió en etanol/agua 1:9 (50 mL). La disolución se mantuvo en atmósfera de H₂ a 50 psi de presión en presencia de paladio sobre carbón (100 mg). En estas condiciones, la eliminación del grupo Cbz y la aminación reductora intramolecular procedieron simultáneamente durante 12 horas. Alternativamente el aducto obtenido en la última etapa (373 mg, 1,26 mmol) se disolvió en etanol/agua 1:9 (50 mL) en presencia de cianoborohidruro sódico (NaCNBH₃) (50 mg). La solución se mantuvo en atmósfera de H₂ a presión atmosférica en presencia de paladio sobre carbón (100 mg). En estas condiciones, se llevó a cabo la eliminación del grupo Cbz mediante acción del paladio y la aminación reductora intramolecular por la presencia de NaCNBH₃. Ambas reacciones procedieron simultáneamente durante 6 horas. A continuación, la mezcla de reacción se filtró sobre alúmina desactivada y se evaporó el filtrado, obteniéndose 164 mg de un sólido de D-fagomina (rendimiento: 89%).

60 $[\alpha]_D^{22} + 20.4$ (c 1.0 en H₂O); δ_H (500 MHz; D₂O; 22°C) 3.86 (1H, dd, *J* 11.8 y 3.0, 7-H), 3.66 (1H, dd, *J* 11.8 y 6.5, 7-H), 3.56 (1H, ddd, *J* 11.5, 9.0 y 5.0, 4-H), 3.21 (1H t, *J* 9.5 y 9.5, 3-H), 3.06 (1H, ddd, *J* 12.9, 4.4 y 2.3, 6-H), 2.68 (1H, dt, *J* 12.94, 12.92 y 2.70, 6-H), 2.61 (1H, ddd, *J* 9.68, 6.44 y 2.97, 2-H), 2.01 (1H, tdd, *J* 13.0, 4.9, 2.5 y 2.5, 5-H) y 1.48 ppm (1H, dq, *J* 13.0, 12,9, 11,5 y 4,5, 5-H); δ_C (101 MHz; D₂O; 22°C) 72.9, 72.7, 61.1, 60.9, 42.6 y 32.1.

65

ES 2 340 967 T3

Ejemplo 2

Síntesis de N-butil-D-fagomina

5 Etapa 1)

Obtención del aducto de adición aldólica como en la sección anterior

10 Etapa 2)

Desprotección y doble aminación reductora

15 El butanal y el aducto resultante de la etapa anterior (150 mg, 0.51 mmol) se disolvieron en etanol/agua 7:3 (10 mL). A esta solución se añadió paladio sobre carbón (50 mg) y la mezcla se dejó reaccionar bajo H₂ a 50 psi durante 12 horas. A continuación el procedimiento fue similar al del ejemplo anterior, y se obtuvieron 52 mg de un sólido de N-butil-D-fagomina (rendimiento: 52%) después de purificar el crudo de reacción mediante columna de sílica empleando mezclas de MeOH/CHCl₃ como eluyentes.

20 $[\alpha]_D^{22} = -24.5$ (c 1.2 en MeOH); δ_H (500 MHz, D₂O, 22°C) 3.90 (1H, dd, J 12.7, y 2.4, 7-H), 3.82 (1H, dd, J 12.7 y 2.9, 7-H), 3.45 (1H, ddd, J 11.5, 9.1 y 5.1, 4-H), 3.30 (1H, t, J 9.4, 3-H), 2.90 (1H, td, J 12.2, 3.5 y 3.5, 6-H), 2.73 (1H, ddd, J 13.3, 11.2 y 5.4, 8-H), 2.50 (1H, ddd, J 13.3, 11.1 y 5.2, 8-H), 2.36 (1H, dt, J 12.6, 12.6 y 2.4, 6-H), 2.16 (1H, td, J 9.8, 2.6 y 2.6 Hz, 2-H), 1.92 (1H tdd, J 12.7, 5.0, 2.5 y 2.5, 5-H), 1.55-1.35 (3H, m, 5-H y 2 x 9-H), 1.30-1.21 (2H, m, 2 x 10-H) y 0.88 (3H, t, J 7.4 y 7.4, 11-Me); δ_C (101 MHz, D₂O, 22°C) 73.2, 72.0, 65.8, 58.1, 52.2, 49.1, 25
25 30.5, 25.6, 20.4 y 13.3.

Ejemplo 3

30 *Síntesis de 1-deoxinojirimicina*

Etapa 1)

Obtención del aducto de adición aldólica

35

El aldehído de partida, (S)-N-Cbz-3-amino-2-hidroxiopropanal, se obtuvo a partir de (S)-3-amino-2-hidroxiopropanol mediante un procedimiento descrito por De Luca *et al.* (De Luca, L., Giacomelli, G., Porcheddu, A., *Org. Lett.* 3 (2001) 3041).

40 El procedimiento fue equivalente al descrito en el Ejemplo 1 con la diferencia de que en este caso la reacción se llevó a cabo a 25°C.

Etapa 2)

45

Desprotección y aminación reductora intramolecular

Se procedió como en el Ejemplo 1 obteniéndose 164 mg de un sólido blanco de 1-deoxinojirimicina (rendimiento: 89%) $[\alpha]_D^{22} + 48.0$ (c 1.0 en H₂O).

50

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ ppm 3.74 (dd, J = 11.8, 3.00 Hz, 1H), 3.56 (dd, J = 11.9, 6.2 Hz, 1H), 3.4 (ddd, J = 10.96, 9.06, 5.25 Hz, 1H), 3.24 (t, J = 9.1, 9.1 Hz, 1H), 3.18 (t, J = 9.4, 9.4 Hz, 1H), 3.1 (dd, J = 12.3, 5.2 Hz, 1H), 2.54 (hept, J = 9.4, 6.0, 3.0, 1 H), 2.43 (dd, J = 12.3, 11.0 Hz, 1H).

55

Ejemplo 4

Síntesis de 1-deoxinojirimicina

60 Etapa 1)

Preparación del aducto de la adición aldólica.

65 El aldehído de partida, (R,S)-N-Cbz-3-amino-2-hidroxiopropanal, se obtuvo a partir del (R,S)-N-Cbz-3-amino-2-hidroxiopropanol (1 g, 4.4 mmol) mediante oxidación con IBX (ácido o-yodoxibenzóico). En un reactor de 250 mL equipado con agitación orbital y reflujo, se disolvió el N-Cbz-3-amino-2-hidroxiopropanol (1 g, 4.4 mmol) en acetato de etilo (150 mL). Se añadió a esta solución el IBX (2.5 g; 2 equivalentes) y la reacción se mantuvo a reflujo durante 3 h.

ES 2 340 967 T3

La solución resultante se filtró y la capa de acetato de etilo se lavó con NaHCO₃ 5% (p/v) y NaCl saturada para eliminar los subproductos de reacción. En un reactor de 500 mL se añadió la solución de acetato de etilo que contenía el (R,S)-N-Cbz-3-amino-2-hidroxiopropanal, sobre una solución acuosa de dihidroxiacetona (510 mg, 5.7 mmol) y la FSA cruda en polvo (235 mg, 3445 U) en un tampón borato-bórico 50 mM pH 8 (250 mL). De la mezcla resultante de dos fases se evaporó el acetato de etilo y esto permitió la difusión del aldehído a la fase acuosa. La reacción se mantuvo, a continuación, en agitación orbital (120 rpm) durante 24 horas a 25°C. En este punto la conversión de reacción fue superior al 98%. A continuación, se añadió el MeOH (250 mL) a la mezcla de crudo de reacción y se separó por centrifugación un residuo sólido. Se purificó el sobrenadante mediante cromatografía líquida de fase reversa para obtener un sólido blanco (600 mg, rendimiento: 44%).

Etapa 2)

Desprotección y aminación reductora intramolecular

El aducto obtenido en la etapa anterior (600 mg, 1.91 mmol) se disolvió en etanol/agua 1:4 (80 mL). La solución se mantuvo durante 12 h en atmósfera de H₂ a una presión de 50 psi en presencia de paladio/carbón (176 mg). En estas condiciones tanto la eliminación de Cbz como la aminación reductora intramolecular procedieron simultáneamente durante un periodo de tiempo de 12 horas. A continuación, la mezcla del crudo de reacción se filtró en alúmina neutra y el filtrado se evaporó para obtener un sólido blanco (164 mg, rendimiento: 89%).

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ ppm 3.74 (dd, J = 11.8, 3.00 Hz, 1H), 3.56 (dd, J = 11.9, 6.2 Hz, 1H), 3.4 (ddd, J = 10.96, 9.06, 5.25 Hz, 1H), 3.24 (t, J = 9.1, 9.1 Hz, 1H), 3.18 (t, J = 9.4, 9.4 Hz, 1H), 3.1 (dd, J = 12.3, 5.2 Hz, 1H), 2.54 (hept, J = 9.4, 6.0, 3.0, 1 H), 2.43 (dd, J = 12.3, 11.0 Hz, 1H).

Ejemplo 5

Síntesis del 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol (DAB)

Etapa 1)

Preparación de un aducto de la adición aldólica

El aldehído de partida, N-Cbz-2-aminoetanal, se obtuvo a partir del 2-aminoetanol mediante procedimientos estándar tales como los descritos por Espelt, L., Parella, T., Bujons, J., Solans, C., Joglar, J., Delgado, A., Clapés, P., *Chem.-Eur. J.* **9** (2003) 4887; Oejo, M., Vicario, J. L., Badía, D., Carrillo, L., Reyes, E., *Synlett* (2005) 2110.

En un reactor de 250 mL equipado con agitación orbital se disolvió el N-Cbz-3-aminoetanal (1.51 g, 7.8 mmol) en dimetilformamida (8 mL). A esta solución se añadió dihidroxiacetona (0.71 g, 7.9 mmol) y una preparación liofilizada con actividad FSA (0.7 g, 1150 U) disuelta en un tampón borato-bórico 50 mM pH 7.0 (72 mL). La reacción procedió bajo agitación orbital (120 rpm) durante 120 horas a 25°C. En este punto la conversión de reacción fue del 49%. A continuación se añadió MeOH (100 mL) y se separó mediante centrifugación un residuo sólido. Se purificó el sobrenadante mediante cromatografía líquida de fase reversa. Las fracciones puras se recogieron y se evaporó el disolvente hasta obtener un sólido blanco (0.50 g, rendimiento: 23%).

Etapa 2)

Desprotección y aminación reductora intramolecular

El aducto obtenido en la etapa previa (500 mg, 1.77 mmol) se disolvió en etanol/agua 1:9 (90 mL). La solución se mantuvo durante 12 h en atmósfera de H₂ a una presión de 50 psi en presencia de Pd/C (204 mg) como catalizador. A continuación la mezcla de crudo de reacción se filtró en alúmina neutra y el filtrado se evaporó para obtener un sólido blanco (253 mg). El producto final se purificó a partir de este sólido mediante cromatografía de intercambio catiónico para obtener una solución acuosa de NH₃ 10 mM. Las fracciones puras se recogieron y se evaporó el disolvente para obtener un sólido blanco (129 mg, rendimiento global: 10%, 99% de exceso diastereomérico).

[α]_D²⁰ + 26.2 (c 1.0 en H₂O); [α]_D²⁰ + 35.2 (c 1.0 en MeOH). ¹H NMR (500 MHz, D₂O, 22°C) δ (ppm): 4.35 (m, 1 H, H4), 4.11 (t, J = 3.3 Hz, 1 H, H3), 3.97 (dd, J = 12.2, 4.6 Hz, 1 H, H6), 3.85 (dd, J = 12.2, 8.3 Hz, 1 H, 6H), 3.63 (dd, J = 8.3, 4.2 Hz, 1 H, H2), 3.59 (dd, J = 12.6, 4.8 Hz, 1H, H 5), 3.37 (dd, J = 12.6, 2.7 Hz, 1H, H5). ¹³C NMR (101 MHz, D₂O, 22°C) δ (ppm): 78.37 (C3), 77.00 (C4), 69.30 (C2), 61.66 (C6), 52.68 (C5).

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 20010018090 A [0005]
- US 005329052 A [0006] [0011]
- US 20060222720 A [0005]
- ES P200602274 [0045]
- WO 2004037001 A [0005]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- Koeller, K. M.; Wong, C. H. *Nat. Biotechnol.*, 2000, vol. 18, 835 [0002]
- Kolter, T.; Wendeler, M. *Chembiochem*, 2003, vol. 4, 260 [0002]
- Asano, N. *J. enzyme Inhib.*, 2000, vol. 15, 215 [0002]
- Asano, N. *Glycobiology*, 2003, vol. 13, 93R [0002] [0003]
- Flaux, H.; Popowycz, F.; Favre, S.; Schutz, C.; Vogel, P.; Gerber-Lemaire, S.; Juillerat-Jeanerret, L. *J. Med. Chem.*, 2005, vol. 48, 4237 [0002]
- Asano, N. *J. Enzyme Inhib.*, 2000, vol. 15, 215 [0003]
- Lillelunh, V. H.; Jensen, H. H.; Liang, X.; Bols, M. *Chem. Rev.*, 2002, vol. 102, 515 [0003]
- Compain, P.; Martin, O. R. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2003, vol. 3, 541 [0003]
- Mehta, G.; Lakshminath, S. *Tetrahedron Lett.*, 2002, vol. 43, 331 [0003]
- Moris-Varas, F.; Qian, X. -H.; Wong, C. -H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, vol. 118 (10), 7647 [0003]
- Fuentes, J.; Olano, D.; Pradera, M. A. *Tetrahedron Lett.*, 1999, vol. 40, 4063 [0003]
- Li, H. Q.; Blerlot, Y.; Chantreau, C.; Mallet, J. M.; Sollogoub, M.; Zhang, Y. M.; Rodríguez-García, EL; Vogel, P.; Jimenez-Barbero, J.; Sinay, P. *Org. Biomol. Chem.*, 2004, vol. 2, 1492 [0003]
- Lin, C. C.; Pan, Y. S.; Patkar, L. N.; Lin, H. M.; Tzou, D. L. M.; Subramanlan, T. *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, vol. 12, 3259 [0003]
- Godin, G.; Garnier, E.; Compain, P.; Martin, O.R.; Ikeda, K.; Asano, N. *Tetrahedron Lett.*, 2004, vol. 45, 579 [0003]
- Platt, F. M.; Butters, T. D. *Drugs*, 2003, vol. 63, 2435 [0004]
- Von der Osten, C.H.; Sinskey, A J.; Barbas, C. F., III; Pederson, R. L.; Wang, Y. F.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, vol. 111, 3924 [0006]
- Romero, A.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.*, 2000, vol. 65, 8264 [0006]
- Look, G. C.; Fotsch, C. H.; Wong, C. H. *Acc. Chem. Res.*, 1993, vol. 26,182 [0006]
- Machajewskif, T. D.; Wong, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, vol. 39, 1353 [0006]
- Jung, S.-H.; Jeong, J.-H.; Miller, P.; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.*, 1994, vol. 59, 7182 [0009]
- Fessner, W. D.; Sinerius, G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1994, vol. 33, 209 [0010]
- Charmantray, F.; El Blidi, L.; Gefflaut, T.; Hecquet, L.; Bolte, J.; Lemaire, M. *J. Org. Chem.*, 2004, vol. 69, 9310 [0010]
- Sánchez-Moreno, I.; Francisco Garcia-Garcia, J.; Bastida, A.; García Junceda, E. *Chem. Commun.*, 2004, 1634 [0010]

ES 2 340 967 T3

• Von der **Osten**, C. H.; **Sinsky**, A. J.; **Barbas**, C. F., III; **Pederson**, R. L.; **Wang**, Y. F.; **Wong**, C. H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, vol. 111, 3924 [0011]

• **Schürmann**, M.; **Sprenger**, G. A. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 11055 [0015] [0023]

• **Casadaban**, M. J. *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 104, 541-555 [0023]

• **Espelt**, L.; **Parella**, T.; **Bujons**, J.; **Solans**, C.; **Joglar**, J.; **Delgado**, A.; **Clapés**, P. *Chem. -Eur. J.*, 2003, vol. 9, 4887 [0028]

• **Ocejo**, M.; **Vicario**, J. L.; **Badfa**, D.; **Carrillo**, L.; **Reyes**, E. *Synlett*, 2005, 2110 [0028]

• **Schurmann**, M.; **Sprenger**, G. A. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 11055 [0030]

• **Thoreli**, S.; **Schurmann**, M.; **Sprenger**, G. A.; **Schnelder**, G. *J. Mol. Biol.*, 2002, vol. 319, 161 [0030]

• **Schurmann**, M.; **Sprenger**, G. A. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2002, vol. 19, 247 [0030]

• **Casadaban**, M. J. *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 104, 541 [0030]

• **Schurmann**, M.; **Sprenger**, G. A. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 11055 [0030]

• **De Luca**, L.; **Giacomelli**, G.; **Porcheddu**, A. *Org. Lett.*, 2001, vol. 3, 3041 [0035]

• **Espelt**, L.; **Parella**, T.; **Bujons**, J.; **Solans**, C.; **Joglar**, J.; **Delgado**, A.; **Clapés**, P. *Chem.-Eur. J.*, 2003, vol. 9, 4887 [0041]

• **Ocejo**, M.; **Vicario**, J. L.; **Badía**, D.; **Carrillo**, L.; **Reyes**, E. *Synlett*, 2005, 2110 [0041]

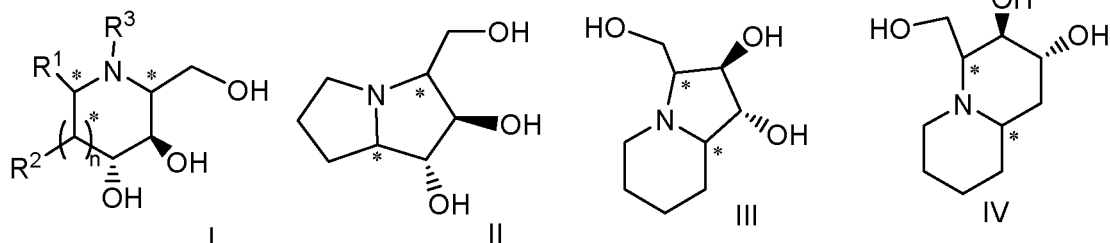
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento quimioenzimático para la preparación de un iminociclitol de fórmula (I), (II), (III) ó (IV):

5

10

15



donde:

20

- R^1 y R^2 son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: H, OH, hidroximetil, metil, etil, butil, pentil, hexil, octil, isopropil, isobutil, 2-metilbutil, y bencil;

25

- R^3 se selecciona del grupo que consiste en: H, hidroximetil, hidroxietil, etil, butil, pentil, hexil, octil, dodecil, isobutil, isopropil, isopentil, 2-metilbutil, bencil, y feniletil;

- n : 0 ó 1;

30

- las configuraciones de los átomos de carbono a los que se unen los sustituyentes R^1 y R^2 en el iminociclitol de fórmula I son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de R y S ; y

- los centros estereogénicos (*) en el iminociclitol de fórmula II, III ó IV son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de R y S ,

caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

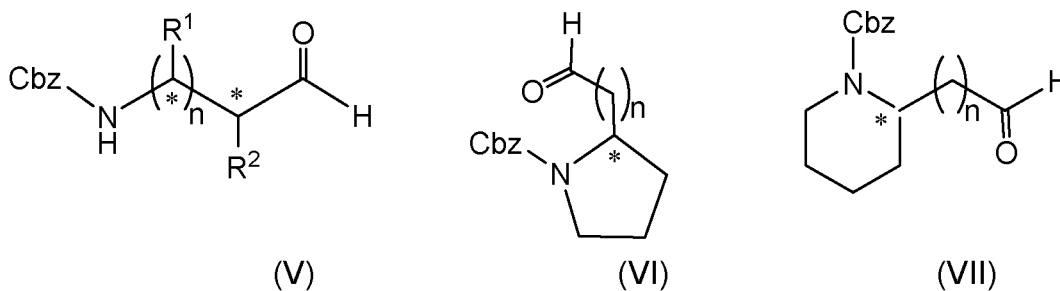
35

i) adición aldólica entre la dihidroxiacetona (DHA) y un aminoaldehído aceptor, catalizada por una enzima D-fructosa-6-fosfato aldolasa, el aminoaldehído siendo de fórmula V, VI ó VII,

40

45

50



donde:

55

- R^1 , R^2 y n son según se definen más arriba,

- las configuraciones de los átomos de carbono a los que se unen los sustituyentes R^1 y R^2 en la fórmula V y el centro estereogénico de las fórmulas VI y VII son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de R y S , y

60

- Cbz representa un grupo benciloxicarbonil;

y

65

ii) una aminación reductora intramolecular del aducto de adición obtenido en la etapa i) con H_2 , en presencia de un catalizador metálico; llevándose a cabo dicha etapa (ii), opcionalmente, con un aldehído de fórmula R^3 -CHO, donde R^3 es según se define más arriba, lo que resulta en una aminación reductora doble.

ES 2 340 967 T3

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el iminociclitol se selecciona del grupo que consiste en: miglitol; miglustat; D-fagomina; 1-deoxinojirimicina; *N*-butyl-D-fagomina; y 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol.

5 3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el iminociclitol se selecciona del grupo que consiste en: D-fagomina; 1-deoxinojirimicina; *N*-butyl-D-fagomina; y 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el iminociclitol se selecciona del grupo que consiste en: D-fagomina; 1-deoxinojirimicina; y *N*-butyl-D-fagomina.

10

5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el aminoaldehído en i) es un aminoaldehído protegido tipo V seleccionado del grupo que consiste en: *N*-Cbz-3-aminopropanal, y (*S*)-*N*-Cbz-3-amino-2-hidroxi-propanal.

15

6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el catalizador metálico utilizado en la etapa ii) se selecciona del grupo que consiste en: Pd, Pt, Rh y combinaciones de Pd y cianoborohidruro sódico (NaCNBH₃).

7. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la enzima FSA tiene un grado de identidad con SEC ID NO: 2 de al menos el 85%.

20

8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque la enzima FSA tiene un grado de identidad con SEC ID NO: 2 de al menos el 95%.

25

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la enzima FSA consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 2.

30

35

40

45

50

55

60

65

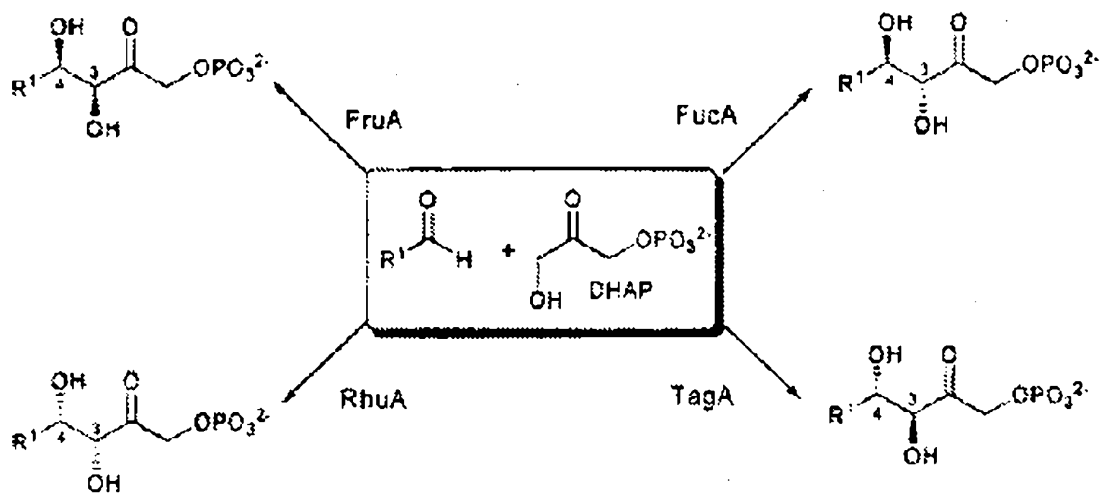


FIG. 1

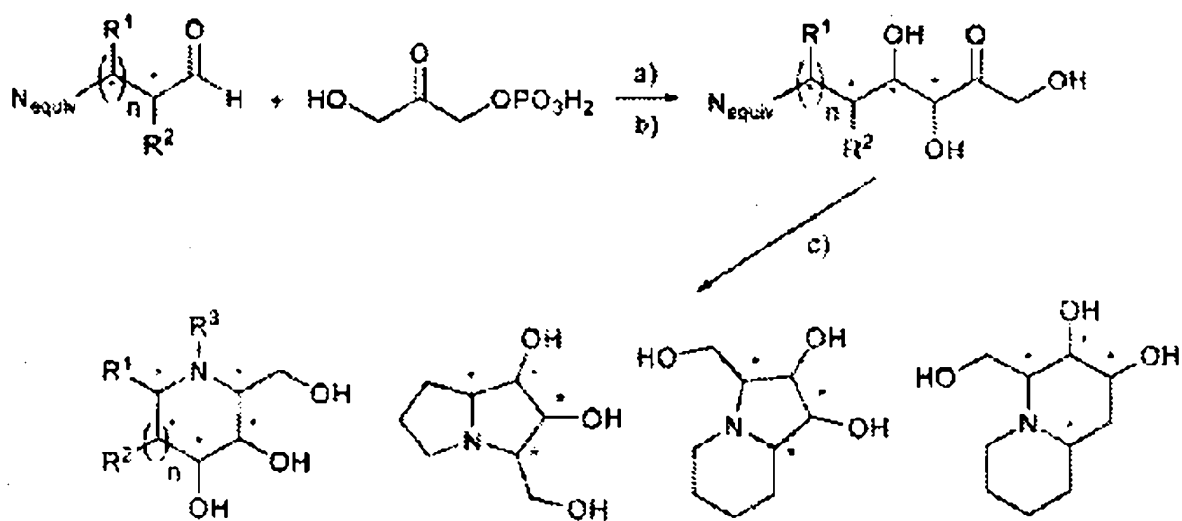


FIG. 2

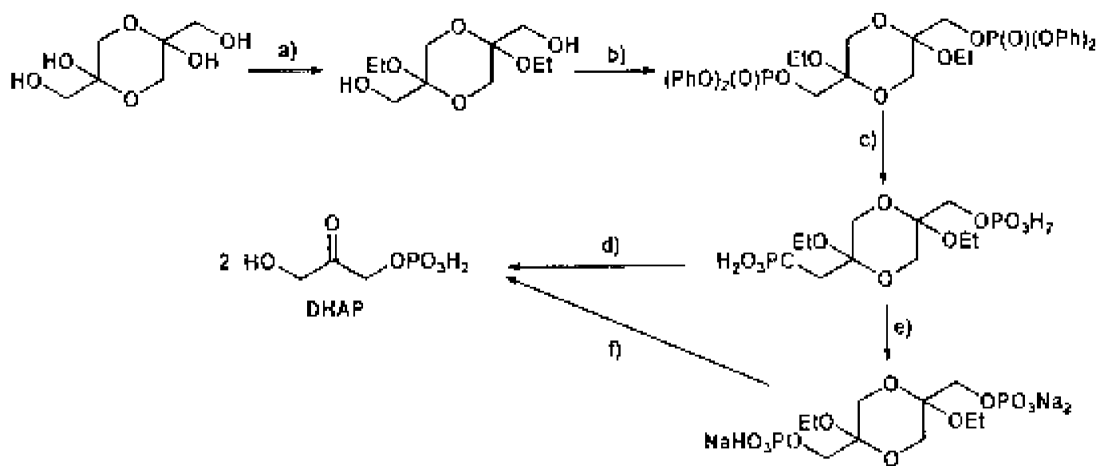


FIG. 3

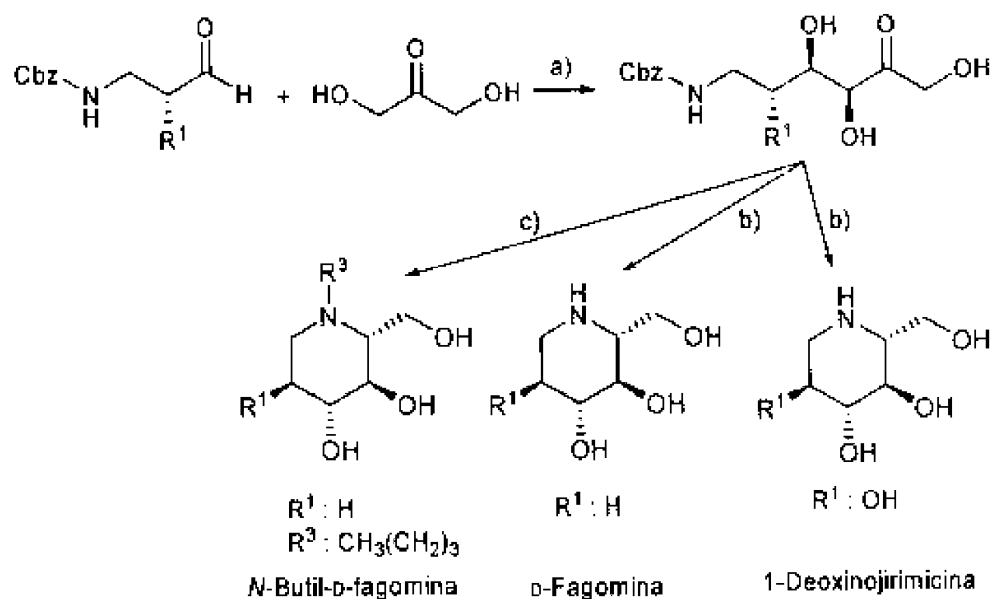


FIG. 4

ES 2 340 967 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Bioglane

5

<120> Procedimiento quimioenzimático para la preparación de iminociclítoles

<130> P958PC00

10

<150> ES P200602274

<151> 2006-09-01

15 <160> 2

<170> PatentIn version 3.3

20 <210> 1

<211> 663

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

25

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(663)

30

<400> 1

35 atg gaa ctg tat ctg gat act tca gac gtt gtt gcg ctg aag gcg ctg 48
Met Glu Leu Tyr Leu Asp Thr Ser Asp Val Val Ala Val Lys Ala Leu
1 5 10 15

40 tca cgt att ttt cag ctg gcg ggt gtg acc met aac cca agc all atc 96
Ser Arg Ile Phe Pro Leu Ala Gly Val Thr Thr Asn Pro Ser Ile Ile
 20 25 30

45

50

55

60

65

ES 2 340 967 T3

5 gcc ggc ggt aaa aaa ccg ctg gat gtt gtg att ccg caa att cat gaa 144
Ala Ala Gly Lys Lys Pro Leu Asp Val Val Leu Pro Gln Leu His Glu
 35 40 45

10 gcc atg ggc ggt cag gag cgt ctg ttt gcc cag gta atg gct acc act 192
Ala Met Gly Gly Gln Gly Arg Leu Phe Ala Gln Val Met Ala Thr Thr
 50 55 60

15 gcc gaa ggg atg gtt aat gac gcg att aag ctg cgt tct att att gcg 240
Ala Glu Gly Met Val Asp Asp Ala Leu Lys Leu Arg Ser Ile Ile Ala
 65 70 75 80

20 gat atc gtc gtg aaa gtt ccg gtg acc gcc cag ggg ctg gca gct att 288
Asp Ile Val Val Lys Val Pro Val Thr Ala Glu Gly Leu Ala Ala Ile
 85 90 95

25 aag atg ttc aaa gcg gaa ggc att ccg acg ctg gga acc gcg gta tat 336
Lys Met Leu Lys Ala Glu Gly Ile Pro Thr Leu Gly Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

30 gcc gca gca caa ggc ctg ctg tcc gcc ctg gca ggt gcc gaa tat gtt 384
Gly Ala Ala Gln Gly Leu Leu Ser Ala Leu Ala Gly Ala Glu Tyr Val
 115 120 125

35 gcc cct tcc gtt aat cgt att gat gct cag gcc ggt agc gcc att cag 432
Ala Pro Tyr Val Asn Arg Ile Asp Ala Gln Gly Gly Ser Gly Ile Gln
 130 135 140

40 act gtg acc gac tta cac cag tta ttc aaa atg cat gcg ccg cag gcg 480
Thr Val Thr Asp Leu His Gln Leu Leu Lys Met His Ala Pro Gln Ala
 145 150 155 160

45 aaa gtg ctg gca gcg agt ttc aaa acc ccg cgt cag gcc ctg gac tgc 528
Lys Val Leu Ala Ala Ser Phe Lys Thr Pro Arg Gln Ala Leu Asp Cys
 165 170 175

50 tta ctg gcc gga tgt gaa lca att act ctg cca ctg gat gtc gca caa 576
Leu Leu Ala Gly Cys Glu Ser Ile Thr Leu Pro Leu Asp Val Ala Gln
 180 185 190

55 cag atg att agc tat ccg gcg gtt gat gcc gcl gtg gcg aag ttt cag 624
Gln Met Ile Ser Tyr Pro Ala Val Asp Ala Ala Val Ala Lys Phe Glu
 195 200 205

60

65

ES 2 340 967 T3

cag gac tgg cag gga gcg ttt ggc aga acg tgg att taa 663
 Gln Asp Trp Gln Gly Ala Phe Gly Arg Thr Ser Ile
 5 210 215 220

<210> 2

10 <211> 220

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

15 <400> 2

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

65