



(11) **EP 2 410 047 B9**

(12) **KORRIGIERTE EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(15) Korrekturinformation:
Korrigierte Fassung Nr. 1 (W1 B1)
Korrekturen, siehe
Beschreibung Abschnitt(e) 13, 14

(51) Int Cl.:
C12N 9/02 ^(2006.01) **C12N 9/04** ^(2006.01)
C12P 33/00 ^(2006.01)

(48) Corrigendum ausgegeben am:
24.08.2016 Patentblatt 2016/34

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung:
01.06.2016 Patentblatt 2016/22

(21) Anmeldenummer: **11177932.8**

(22) Anmeldetag: **07.12.2007**

(54) **Oxidoreduktase und deren Verwendung zur Reduktion von Secodionderivaten**

Oxidoreductase and its use for the reduction of secodione derivatives

Oxydo-réductase et son utilisation dans la réduction de dérivés de sécodione

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE BG CH DE ES FR GB HU IT LI NL PL SE

(30) Priorität: **07.12.2006 AT 20272006**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
25.01.2012 Patentblatt 2012/04

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)
nach Art. 76 EPÜ:
07856445.7 / 2 087 127

(73) Patentinhaber: **Cambrex IEP GmbH**
65203 Wiesbaden (DE)

(72) Erfinder:
• **Gupta, Antje**
65207 Wiesbaden (DE)
• **Tschentscher, Anke**
65347 Eltville - Hattenheim (DE)

• **Dupont, Maria**
50354 Hürth (DE)

(74) Vertreter: **Plate, Jürgen et al**
Plate Schweitzer Zounek
Patentanwälte
Rheingaustrasse 196
65203 Wiesbaden (DE)

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A1- 1 152 054 WO-A-2006/087235
WO-A1-2007/073875 DE-A1-102005 044 736

• **SZENTIRMAI, A. ET AL.: "Properties of**
hydroxysteroid oxidoreductase isolated from
yeast", ACTA MICROBIOLOGICA ACADEMIAE
SCIENTIARUM HUNGARICAE, Bd. 22, Nr. 4, 1975,
Seiten 463-470, XP008095188,

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

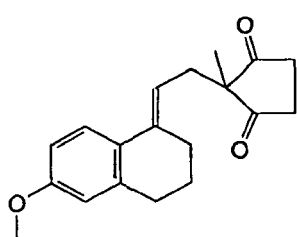
EP 2 410 047 B9

Beschreibung

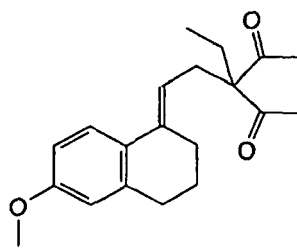
[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Oxidoreduktase für die enantioselektive enzymatische Reduktion von Secodionderivaten der allgemeinen Formel I, wobei das Secodionderivat mit einer Oxidoreduktase/Dehydrogenase in Gegenwart von NADH oder NADPH als Cofactor reduziert wird.

[0002] Die industrielle Darstellung von Steroidhormonen erfolgt auf zwei, voneinander unabhängigen Wegen, nämlich zum einen ausgehend von natürlich vorkommenden Steroidverbindungen aus pflanzlichen Quellen und zum anderen totalsynthetisch durch enantioselektive Synthese aus prochiralen Vorstufen. Von diesen beiden Wegen gewinnt die Steroidtotalsynthese zunehmend an Bedeutung, zumal diese auch die Einführung von Strukturelementen erlaubt, die in natürlich vorkommenden Steroiden nicht enthalten sind.

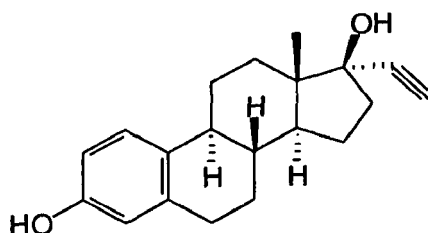
[0003] Schlüsselbausteine der Totalsynthese von enantiomerenreinen Steroiden sind dabei Verbindungen der allgemeinen Formel I, welche auch als Secosteroide, 8,14-seco-gona-tetraen-14,17-dione oder Secodione bezeichnet werden. Spezielle Vertreter dieser Gruppe sind zum Beispiel die Verbindungen Methylsecodion (Formel II, 13-Methyl-3-methoxy-8,14-seco-gona-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14,17-dion) und Ethylsecodion (Formel III, 13-Ethyl-3-methoxy-8,14-seco-gona-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14,17-dion), aus denen beispielsweise die pharmakologisch wirksamen Verbindungen Ethinylestradiol (Formel IV) und Norgestrel (Formel V) hergestellt werden können.



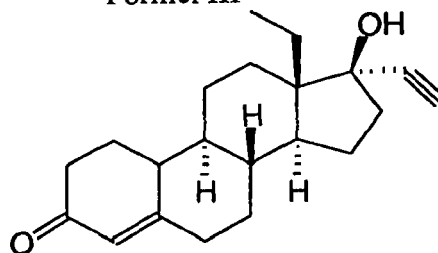
Formel II



Formel III



Formel IV



Formel V

[0004] Schlüsselschritt bei der Darstellung enantiomerenreiner Steroidverbindungen ist dabei die Überführung der Verbindung der Formel I (z.B. II und III) in eine optisch aktive Verbindung mit vorgebildetem asymmetrischem C-13 durch enantioselektive Reduktion einer der Ketogruppen zur Hydroxygruppe. Die resultierenden optisch aktiven Hydroxysecosteroidverbindungen (Secole, Formeln VI bis IX) können anschließend durch Zyklisierung unter Erhalt der Chiralität zu chiralen Steroidverbindungen weiterverarbeitet werden.

[0005] Durch enantioselektive Reduktion einer Ketogruppe der Verbindung der Formel I können theoretisch vier optisch aktive Verbindungen gebildet werden (Formeln VI bis IX).

5

10

15

20

25

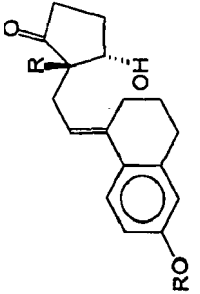
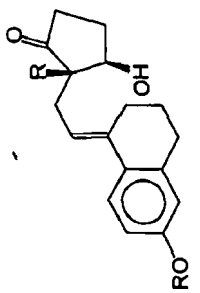
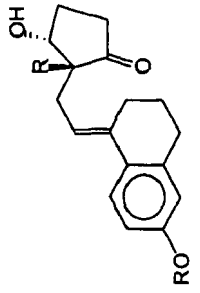
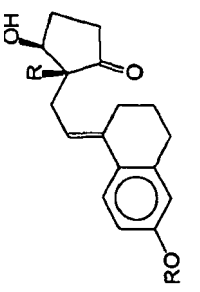
30

35

40

45

50

	Formel IX (14-alpha-OH)
	Formel VIII (14-beta-OH)
	Formel VII (17-alpha-OH)
	Formel VI (17-beta-OH)

55

[0006] Wirtschaftlich von besonderem Interesse sind dabei Verbindungen der Formel VI, bei denen die Hydroxygruppe an der Position 17 die beta-Konfiguration aufweist, da diese zu Derivaten des natürlichen Östron führen. Solche Verbindungen werden auch als 17-beta-Hydroxysecosteroide bezeichnet.

[0007] Die stereoselektive Reduktion von Secodionderivaten der allgemeinen Formel I mit Hilfe verschiedener Mikroorganismen wurde besonders intensiv in den 1960er und 1970er Jahren untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass verschiedene Hefestämme der Gattung *Candida*, *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* und *Hansenula* in der Lage sind Secodione zu den verschiedenen Hydroxyverbindungen zu reduzieren (US 3616226, US 1252524, US 3616225).

[0008] Insbesondere Hefen der Gattung *Saccharomyces* wie beispielsweise *S. uvarum* können vorteilhaft eingesetzt werden, um beispielsweise die entsprechenden 17-beta-Hydroxysecosteroide darzustellen (Kosmol et al; Liebigs Ann. Chem. 701,199 (1967)). Andere Hefestämme wie beispielsweise *Saccharomyces drosophilorum* reduzieren Secodion bevorzugt zum korrespondierenden 14-alpha-Hydroxysecosteroid (Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 22,463-471 (1975)). Die Bildung des 14-alpha-Hydroxysecosteroids wird des weiteren auch durch Reduktion von Secodion mittels *Bacillus thuringiensis* beschrieben (Kosmol et al.; Liebigs Ann. Chem. 701,199 (1967)).

[0009] Gestagen- und Östrogenwirkstoffe finden weltweit breite Anwendung als Kontrazeptiva und in der Hormonersatztherapie. Bis heute sind die meisten Synthesen von Östrogen- und Gestagenderivaten auf dem oben beschriebenen Reaktionsprinzip aufgebaut, dessen Schlüsselschritt die enantioselektive Reduktion von Secodionen zu den entsprechenden 17-beta-Hydroxysecosteroiden darstellt.

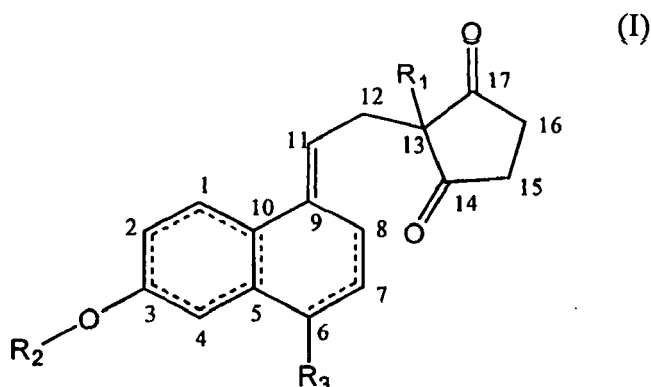
[0010] Die stereoselektive Reduktion der Secodionderivate wird dabei bis heute als Ganzzellbiotransformation mittels verschiedener Hefestämme der Gattung *Pichia* oder *Saccharomyces* durchgeführt. Diese Verfahren besitzen jedoch den Nachteil, dass nur sehr geringe Substratkonzentrationen von weit unter 1% (i.d.R. 1 bis 5 g/l) realisierbar sind (US 3697379; Current Science, Feb.5 (1984), Vol.53. No. 3, Seite 124; Indian Journal of Experimental Biology, Vol.27, August 1989, Seite 742-743). Dadurch gestaltet sich insbesondere die Aufarbeitung und Isolierung des Reaktionsproduktes aus großen Volumina sowie die Abtrennung großer Mengen von Biomasse sehr aufwendig.

[0011] Nach Wissen der Erfinder wurden die an der Reduktion beteiligten Enzyme bislang nicht isoliert, identifiziert und beschrieben. Ebenso wurden noch keine DNA-Sequenzen identifiziert, die für Oxidoreduktasen codieren, mit denen die Reduktion von Secodionderivaten erreicht werden kann.

[0012] EP 1 152 054 B1 offenbart ein Polynukleotid, ein von dem Polynukleotid codiertes Polypeptid und ein Verfahren zur asymmetrischen Reduktion von tert-Butyl-(S)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat zu tert-Butyl-(3R, 5S)-6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoat, wobei die Reduktionsreaktion mittels des Polypeptids katalysiert wird. Das Polynukleotid und das Polypeptid sind von Mikroorganismen der Gattung *Candida*, insbesondere der Spezies *Candida magnoliae* IFO 0705 ableitbar.

[0013] Die Erfindung stellt sich daher die Aufgabe, eine Oxidoreduktase bereitzustellen, mit der Secodionderivate der allgemeinen Formel I, insbesondere solche der Formel II und III, enantioselektiv reduziert werden können. Unter anderem soll hierdurch auch die Herstellung der entsprechenden 17-beta-Hydroxysecosteroide möglich sein.

[0014] Der Schutzbereich der Erfindung wird durch die Ansprüche 1 bis 3 bestimmt. In einem ersten Aspekt wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch eine Oxidoreduktase für die enantioselektive enzymatische Reduktion von Secodionderivaten der allgemeinen Formel I gelöst,



worin die Ringstrukturen kein, ein oder mehrere Heteroatome umfassen,

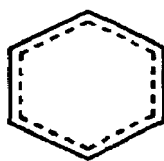
R_1 Wasserstoff oder eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe ist,

R_2 Wasserstoff, eine C_1 - C_8 -Alkylgruppe oder eine OH- Schutzgruppe, wie ein Ester, ist,

R_3 Wasserstoff, eine Methylgruppe oder ein Halogenid ist,

das Strukturelement

5



10 einen Benzolring oder einen C₆-Ring mit 0, 1 oder 2 C-C-Doppelbindungen repräsentiert, an den Positionen 6/7 oder 7/8 gegebenenfalls eine Doppelbindung enthalten ist und der Kohlenstoff an den Positionen 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 und 16 unabhängig mit Wasserstoff, einer C₁-C₄-Alkylgruppe, einem Halogenid oder einer Phenylgruppe substituiert ist, wobei die Oxidoreduktase/Dehydrogenase das Secodionderivat in Gegenwart von NADH oder NADPH als Cofactor reduziert.

15 **[0015]** Das Secodionderivat wird in einer Konzentration von >10 g/l im Reaktionsansatz eingesetzt und der durch die Oxidoreduktase/Dehydrogenase gebildete oxidierte Cofactor NAD oder NADP wird kontinuierlich regeneriert.

[0016] Dieses Verfahren stellt eine wesentliche Verbesserung der enantioselektiven enzymatischen Reduktion von Secodionderivaten gegenüber dem Stand der Technik dar. Die erfindungsgemäße Oxidoreduktase ermöglicht die Reduktion von Secodionderivaten zu den verschiedenen korrespondierenden Hydroxysecosteroiden mit freien Enzymen
20 in Konzentrationsbereichen, die weit über die im Stand der Technik Beschriebenen hinausgehen. In einem zweiten Aspekt wird eine erfindungsgemäße Oxidoreduktase für die enantioselektive enzymatische Reduktion von Secodionderivaten der allgemeinen Formel I eingesetzt, wobei das Secodionderivat mit einer Oxidoreduktase/Dehydrogenase in Gegenwart von NADH oder NADPH als Cofactor reduziert wird, und die Oxidoreduktase/Dehydrogenase

25 a) eine Aminosäuresequenz aufweist, bei welcher mindestens 80% der Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3 identisch sind oder

b) von der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:8 codiert wird und von einer Nukleinsäuresequenz codiert wird, die mit SEQ ID NO:8 unter stringenten Bedingungen hybridisiert, wobei die stringenten Bedingungen die Hybridisierung in 0,7-1 M NaCl-Lösung bei 60°C umfassen.

30 **[0017]** Von den Erfindern wurden Oxidoreduktasen identifiziert, die in der Lage sind, Secodionderivate zu Hydroxysecosteroiden zu reduzieren, und die rekombinant industriell hergestellt werden können. Durch die erfindungsgemäße Oxidoreduktase können wesentlich höhere Substratkonzentrationen erzielt werden als bei den aktuell verwendeten Ganzzellverfahren.

35 **[0018]** In dem Verfahren kann die Oxidoreduktase mit der Sequenz SEQ ID NO:3 bzw. ein von diesem Polypeptid ableitbares Polypeptid entweder vollständig gereinigt, teilweise gereinigt oder als Zellen, enthaltend das Polypeptid SEQ ID NO:3 eingesetzt werden. Die eingesetzten Zellen können dabei nativ, permeabilisiert oder lysiert vorliegen. Bevorzugt werden die Oxidoreduktasen bzw. davon ableitbare Derivate in einem geeigneten Wirtsorganismus, wie beispielsweise *Escherichia coli*, überexprimiert und das rekombinante Polypeptid zur Reduktion der Secodionderivate der allgemeinen Formel I eingesetzt.

[0019] Eine nicht erfindungsgemäße DNA-Sequenz SEQ ID NO:6, die für ein Polypeptid mit der SEQ ID NO:1 codiert, ist beispielsweise aus dem Genom des Organismus *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635 erhältlich.

[0020] Eine nicht erfindungsgemäße DNA-Sequenz SEQ ID NO:7, die für ein Polypeptid mit der SEQ ID NO:2 codiert, ist beispielsweise aus dem Genom des Organismus *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941 erhältlich.

45 **[0021]** Eine DNA-Sequenz SEQ ID NO:8, die für ein Polypeptid mit der SEQ ID NO:3 codiert, ist erhältlich aus einer Hefe *Candida magnoliae* CBS 6396.

[0022] Nicht erfindungsgemäße Oxidoreduktasen der SEQ ID NO:4 und SEQ ID NO:5 sind beispielsweise erhältlich durch Homologiescreening aus *Candida magnoliae* DSMZ 70638.

[0023] Unter einer Nukleinsäuresequenz, welche beispielsweise mit der SEQ ID NO:6 unter stringenten Bedingungen hybridisiert, versteht man ein Polynukleotid, welches mittels der Kolonie-Hybridisierungsmethode, der Plaque-Hybridisierungsmethode, der Southern-Hybridisierungsmethode oder Vergleichbarem unter Verwendung der SEQ ID NO:6 oder Teilsequenzen von SEQ ID NO:6 als DNA-Sonde identifiziert werden kann. Zu diesem Zweck wird das an einem Filter immobilisierte Polynukleotid beispielsweise mit der SEQ ID NO:6 in einer 0,7-1 M NaCl-Lösung bei 60°C hybridisiert. Die Hybridisierung wird, wie z.B. in Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) oder ähnlichen Publikationen beschrieben, durchgeführt.

[0024] Anschließend wird der Filter mit 0,1 bis 2-facher SSC-Lösung bei 65°C gewaschen, wobei unter 1-facher SSC-Lösung ein Gemisch, bestehend aus 150 mM NaCl und 15 mM Natriumcitrat, verstanden wird.

[0025] Ein Polynukleotid, das mit den Polynukleotiden SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 oder

SEQ ID NO:10 aus der Sequenzliste unter oben genannten stringenten Bedingungen hybridisiert, weist zumindest 80% Sequenzidentität mit den Polynukleotidsequenzen SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 oder SEQ ID NO:10, vorzugsweise zumindest 95% Identität auf.

[0026] In einem weiteren Aspekt wird in einem Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion von Secodionderivaten der allgemeinen Formel I das Secodionderivat mit einer Oxidoreduktase/Dehydrogenase in Gegenwart von NADH oder NADPH als Cofactor reduziert, wobei die Oxidoreduktase/Dehydrogenase eine Länge von 230 bis 260 Aminosäuren aufweist und eine oder mehrere der Partialsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus [den Sequenzen SEQ ID NO: 18 bis SEQ ID NO:42]

nalvtgasrgig, nalvtggsrgig, nalitggsrgig, nalitgasrgig, nalitggsrgmg, halvtgasrgig,

gysvtla, gynvtla, gysvtlv, gynvtlv,

fkgaplpa, fkaaplpa,

fvsnag, ffsnag, fvcnag, fvanag,

spialtkal, spvaltkti, spialtktl, spvamtka, sqialtkal,

avysask, avysatk,

pikgwi und pisgwi,

umfasst.

[0027] In den Verfahren wird als Co-Faktor NADH oder NADPH eingesetzt. Unter dem Begriff "NADP" wird Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, unter "NADPH" reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat verstanden. Der Begriff "NAD" bedeutet Nicotinamid-adenin-dinucleotid, der Begriff "NADH" reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid.

[0028] Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens, bei dem das Secodionderivat in einer Konzentration von >10 g/l im Reaktionsansatz eingesetzt wird und der durch die Oxidoreduktase/Dehydrogenase gebildete oxidierte Cofactor NAD oder NADP kontinuierlich regeneriert wird, weist die Oxidoreduktase/Dehydrogenase

a) eine Aminosäuresequenz auf, bei welcher mindestens 80% der Aminosäuren mit jenen der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3 identisch sind, oder

b) wird die Oxidoreduktase/Dehydrogenase von der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:8 codiert.

[0029] Gemäß einer anderen Ausführungsform des Verfahrens, bei dem das Secodionderivat in einer Konzentration von >10 g/l im Reaktionsansatz eingesetzt wird und der durch die Oxidoreduktase/Dehydrogenase gebildete oxidierte Cofactor NAD oder NADP kontinuierlich regeneriert wird, weist die Oxidoreduktase/Dehydrogenase eine Länge von 230 bis 260 Aminosäuren auf und umfasst eine oder mehrere der Partialsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus [den Sequenzen SEQ ID NO: 18 bis SEQ ID NO:42] nalvtgasrgig, nalvtggsrgig, nalitggsrgig, nalitgasrgig, nalitggsrgmg, halvtgasrgig, gysvtla, gynvtla, gysvtlv, gynvtlv, fkgaplpa, fkaaplpa, fvsnag, ffsnag, fvcnag, fvanag, spialtkal, spvaltkti, spialtktl, spvamtka, sqialtkal, avysask, avysatk, pikgwi und pisgwi.

[0030] Vorzugsweise wird bei den Verfahren gemäß dem zweiten und dritten Aspekt der durch die Oxidoreduktase/Dehydrogenase gebildete oxidierte Cofactor NAD oder NADP kontinuierlich regeneriert.

[0031] Gemäß einer Ausführungsform der Verfahren wird der oxidierte Cofactor NAD oder NADP durch Oxidation eines Alkohols regeneriert.

[0032] Als Cosubstrat werden dabei bevorzugt primäre und sekundäre Alkohole, wie Ethanol, 2-Propanol, 2-Butanol, 2-Pentanol, 3-Pentanol, 4-Methyl-2-pentanol, 2-Hexanol, 2-Heptanol, 2-Octanol oder Cyclohexanol eingesetzt. Der Anteil des Cosubstrates für die Regenerierung kann 5 bis 95 Vol%, bezogen auf das Gesamtvolumen, betragen.

[0033] Vorzugsweise wird zur Cofaktorregenerierung ein sekundärer Alkohol mit der allgemeinen Formel $R_X R_Y \text{CHOH}$ verwendet wird, wobei R_X und R_Y unabhängig voneinander Wasserstoff, eine verzweigte oder unverzweigte C_1 - C_8 -Alkylgruppe sind und $C_{\text{insgesamt}} \geq 3$.

[0034] Gemäß einer anderen Ausführungsform der Verfahren wird zur Regenerierung des Cofaktors zusätzlich eine Oxidoreduktase/ Dehydrogenase zugesetzt.

[0035] Geeignete NADH-abhängige Alkoholdehydrogenasen sind beispielsweise erhältlich aus Bäckerhefe, aus *Candida parapsilosis* (CPCR) (US 5,523,223 und US 5,763,236, Enzyme Microb. Technol., 1993, 15(11):950-8), *Pichia capsulata* (DE 10327454.4), aus *Rhodococcus erythropolis* (RECR) (US 5,523,223), *Nocardia fusca* (Biosci. Biotechnol. Biochem., 63(10), 1999, S. 1721-1729; Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003, 62(4):380-6; Epub 2003, Apr. 26) oder *Rhodococcus ruber* (J. Org. Chem., 2003, 68(2):402-6). Geeignete Cosubstrate für diese Alkoholdehydrogenasen sind beispielsweise die bereits genannten sekundären Alkohole wie 2-Propanol (Isopropanol), 2-Butanol, 2-Pentanol, 4-Methyl-2-pentanol, 2-Octanol oder Cyclohexanol.

[0036] Geeignete sekundäre Alkoholdehydrogenasen zur Regenerierung des NADPH sind beispielsweise solche, wie beschrieben und isoliert aus Organismen der Ordnung Lactobacillales, z.B. *Lactobacillus kefir* (US 5,200,335), *Lactobacillus brevis* (DE 19610984 A1; Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2000 Dec; 56 Pt 12:1696-8), *Lactobacillus minor* (DE 10119274), *Leuconostoc carnosum* (A 1261/2005, Kl. C12N) oder solche, wie beschrieben aus *Thermoanaerobium brockii*, *Thermoanaerobium ethanolicus* oder *Clostridium beijerinckii*.

[0037] Zur Cofactorregenerierung können prinzipiell aber auch andere enzymatische Systeme verwendet werden. Beispielsweise kann die Cofactorregenerierung mittels NAD- oder NADP-abhängiger Formiat-Dehydrogenase (Tishkov et al., J. Biotechnol. Bioeng. [1999] 64, 187-193, Pilot-scale production and isolation of recombinant NAD and NADP specific formate dehydrogenase) durchgeführt werden. Geeignete Cosubstrate der Formiat-Dehydrogenase sind

beispielsweise Salze der Ameisensäure, wie Ammoniumformiat, Natriumformiat oder Calciumformiat.

[0038] Der in den Verfahren erreichte TTN (total turn over number = mol reduzierte Secodionverbindung / mol eingesetzter Cofactor) liegt in der Regel im Bereich von 10^2 bis 10^5 , vorzugsweise beträgt er jedoch $\geq 10^3$.

[0039] Gemäß einer Ausführungsform werden die Verfahren in einem wässrigen organischen Zweiphasensystem durchgeführt.

[0040] Demgemäß erfolgt die Umsetzung des Secodionderivates in einem Zweiphasensystem, enthaltend beispielsweise einen 2-Alkohol zur Cofactorregenerierung, eine Oxidoreduktase, Wasser, Cofactor und die Secodionverbindung. Es können aber noch zusätzliche organische Lösungsmittel enthalten sein, die nicht an der Cofactorregenerierung beteiligt sind, d.h. keine oxidierbare Hydroxygruppen enthalten. Vorzugsweise werden als zusätzliche organische Lösungsmittel Diethylether, tertiär-Butylmethylether, Diisopropylether, Dibutylether, Ethylacetat, Butylacetat, Heptan, Hexan, Toluol, Dichlormethan, Cyclohexan oder Gemische davon eingesetzt.

[0041] Der Anteil der nicht wassermischbaren organischen Komponenten des Zweiphasensystems kann dabei von 10% bis 90%, bevorzugt von 20% bis 80%, bezogen auf das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes, betragen. Der wässrige Anteil kann von 90% bis 10%, bevorzugt von 80% bis 20%, bezogen auf das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes, betragen.

[0042] Dem Wasser kann auch ein Puffer zugesetzt werden, beispielsweise Kaliumphosphat-, Tris/HCl-, Glycin- oder Triethanolamin-Puffer mit einem pH-Wert von 5 bis 10, vorzugsweise von 6 bis 9. Der Puffer kann zusätzlich noch Ionen zur Stabilisierung oder Aktivierung beider Enzyme enthalten, beispielsweise Magnesiumionen oder Zinkionen.

[0043] Des weiteren können in den Verfahren noch weitere Zusätze zur Stabilisierung der verwendeten Enzyme eingesetzt werden, beispielsweise Glycerin, Sorbitol, 1,4-DL-Dithiothreitol (DTT) oder Dimethylsulfoxid (DMSO).

[0044] Die Konzentration des Cofaktors NAD(P)H, bezogen auf die wässrige Phase, beträgt von 0,001 mM bis 10 mM, insbesondere von 0,01 mM bis 1,0 mM. Die Temperatur kann in Abhängigkeit von den speziellen Eigenschaften der eingesetzten Enzyme von 10°C bis 70°C betragen, bevorzugt von 20°C bis 35°C.

[0045] Die zu reduzierenden Secodionderivate sind in der Regel schwer wasserlöslich. Das Substrat kann daher während der Reaktion vollständig oder auch unvollständig gelöst vorliegen. Ist das Substrat im Reaktionsgemisch nicht vollständig gelöst, so liegt ein Teil des Substrates in fester Form vor und kann so eine dritte feste Phase bilden. Das Reaktionsgemisch kann während der Umsetzung auch zeitweise eine Emulsion bilden.

[0046] Das Secodionderivat der allgemeinen Formel I wird in den Verfahren vorzugsweise in einer Menge von 10g/l bis 500 g/l, bevorzugt von 25 g/l bis 300 g/l, besonders bevorzugt von 50g/l bis 200g/l, bezogen auf das Gesamtvolumen, im Reaktionsansatz eingesetzt.

[0047] Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind ferner dadurch gekennzeichnet, dass als Secodionderivat 13-Ethyl-3-methoxy-8,14-seco-gona-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14,17-dion (Ethylsecodion - Formel III) oder 13-Methyl-3-methoxy-8,14-seco-gona-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14,17-dion (Methylsecodion - Formel II) eingesetzt wird.

[0048] Die Verfahren werden beispielsweise in einem Reaktionsgefäß aus Glas oder Metall durchgeführt. Dazu werden die Komponenten einzeln in das Reaktionsgefäß überführt und unter einer Atmosphäre von beispielsweise Stickstoff oder Luft gerührt. Je nach eingesetzter Secodionverbindung und Oxidoreduktase beträgt die Reaktionszeit von einer Stunde bis 7 Tage, insbesondere von 2 Stunden bis 48 Stunden. In dieser Zeit wird die Secodionverbindung zu mindestens 50 % zur korrespondierenden Hydroxysecosteroidverbindung reduziert.

[0049] Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1 (nicht erfindungsgemäß)

Klonierung einer Oxidoreduktase aus *Chloroflexus auratiacus* DSM 635

A) Anzucht von *Chloroflexus auratiacus* DSM 635

[0050] Zellen von *Chloroflexus auratiacus* DSM 635 wurden in folgendem Medium (pH 8,2) bei 48°C in einem Bakterien-Inkubator bei Licht kultiviert: 0,1 % Hefeextrakt, 0,1 % Glycyl-Glycin, 0,01 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,01 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,01 % KNO_3 , 0,05 % NaNO_3 , 0,01 % NaCl , 0,005 % $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 5 ml einer 0,01 % Fe(III)citrat-Lösung, 1 ml Spurenelemente-Lösung SL-6 [500 µl/l H_2SO_4 , 2,28 g/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 500 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 500 mg H_3BO_3 , 25 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 25 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 45 mg/l $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$]. Am Tag 12 der Kultivierung wurden Zellen mittels Zentrifugation vom Kulturmedium separiert und bei -80°C gelagert.

B) Amplifikation des für selektive Oxidoreduktase kodierenden Gens

[0051] Genomische DNA wurde nach der in "Molecular cloning" von Manniatis & Sambrook beschriebenen Methode extrahiert. Die resultierende Nukleinsäure diente als Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern, die von der in der NCBI Datenbank unter der Nummer 76258197 publizierten Gen-Sequenz abgeleitet wurden. Dabei wurden die Primer für eine nachfolgende Klonierung in einen Expressionsvektor 5'-terminal mit Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen *Nde I* und *Hind III* bzw. *Sph I* versehen (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13).

[0052] Die Amplifizierung wurde in einem PCR-Puffer [10 mM Tris-HCl, (pH 8,0); 50 mM KCl; 10 mM MgSO₄; 1 mM dNTP Mix; je 20 pMol Primer und 2,5 U Platinum Pfx DNA-Polymerase (Invitrogen)] mit 500 ng genomischer DNA und folgenden Temperatur-Zyklen durchgeführt:

Zyklus 1:	94°C, 2 min
Zyklus 2 x 30:	94°C, 30 sec
	56°C, 30 sec
	68°C, 60 sec
Zyklus 3:	68°C, 7 min
	4°C, ∞

[0053] Das resultierende PCR-Produkt einer Größe von etwa 750 bp wurde nach der Reinigung über ein 1 % Agarose-Gel mit Hilfe von Endonukleasen *Nde I* und *Hind III*, bzw. mit Endonucleasen *Sph I* und *Hind III* restringiert und in das mit gleichen Endonukleasen behandelte Rückgrad des pET21a Vectors (Novagen) bzw. pQE70 Vectors (Qiagen) ligiert. Nach der Transformation von 2 µl des Ligationsansatzes in *E. coli* Top 10 F' Zellen (Invitrogen) wurden Plasmid-DNAs Ampicillin-(bzw. Kanamycin)-resistenter Kolonien mittels einer Restriktionsanalyse mit den Endonukleasen *Nde I* und *Hind III* bzw. den Endonucleasen *Sph I* und *Hind III* auf das Vorhandensein eines 750 bp großen Inserts getestet. Plasmid-Präparationen aus den für das Fragment positiven Klonen wurden einer Sequenzanalyse unterzogen und anschließend in *Escherichia coli* BL21 Star (Invitrogen), bzw. *E. coli* RB791 (genetic stock, Yale) transformiert.

Beispiel 2 (nicht erfindungsgemäß)Expression von rekombinanter Chloroflexus Oxidoreduktase in *E. coli*

[0054] Die mit dem Expressionskonstrukt transformierten *Escherichia coli*-Stämme BL21 Star (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bzw. RB791 (*E. coli* genetic stock, Yale, USA) wurden in 200 ml LB-Medium (1% Tryptone, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl) mit Ampicillin (50 µg/ml) bzw. Carbenicillin (50 µg/ml) kultiviert, bis eine optische Dichte (OD) von 0,5, gemessen bei 550 nm, erreicht wurde. Die Expression von rekombinantem Protein wurde durch Zugabe von Isopropylthiogalaktosid (IPTG) in einer Konzentration von 0,1 mM induziert. Nach 8 Stunden bzw. 16 Stunden Induktion bei 25°C und 220 Upm wurden die Zellen geerntet und bei -20°C eingefroren. Für den Aktivitätstest wurden 10 mg Zellen mit 500 µl 100 mM TEA Puffer pH 7,0 und 500 µl Glasperlen versetzt und 10 min mittels einer Kugelmühle aufgeschlossen. Das erhaltene Lysat wurde dann verdünnt für die entsprechenden Messungen eingesetzt. Der Aktivitätstest setzte sich wie folgt zusammen: 870 µl 100 mM TEA Puffer pH 7,0, 160 µg NADH, 10 µl verdünntes Zelllysats. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl einer 100 mM Substratlösung zum Reaktionsgemisch gestartet.

[0055] Für die Enzymgewinnung in großen Mengen wurden 30 g Zellen in 150 ml Triethanolaminpuffer (100 mM, pH 7, 2 mM MgCl₂, 10 % Glycerin) resuspendiert und mittels Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Die Enzymlösung wurde anschließend mit 150 ml Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

Beispiel 3Anzucht von Organismen und Screening nach reduktiver Umsetzung von Ethylsecodion (Formel III)

[0056] Zum Screening wurden die Hefestämme *Pichia farinosa* DSM 70362, *Candida gropengiesseri* MUCL 29836, *Candida vaccinii* CBS 7318, *Pichia farinosa* DSM 3316, *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1508 und *Candida magnoliae* CBS 6396 in folgendem Medium kultiviert: Hefeextrakt (5), Pepton (5) und Glucose (20) (Zahlen in Klammern sind jeweils g/L). Das Medium wurde bei 121 °C sterilisiert und die Hefen wurden ohne weitere pH-Regulierung bei 25°C auf einem Schüttler bei 140 Umdrehungen pro Minute kultiviert.

[0057] Die reduktive Umsetzung von Ethylsecodion der Formel III zur entsprechenden Hydroxysecosteroidverbindung wurde in folgenden Ganzzellbiotransformations-Ansätzen getestet:

400 mg frisch geerntete Zellen wurden in einem Ansatz mit 50 mg Glucose, 10 mg Ethylsecodion der Formel III und 900 µl 100 mM Triethanolamin Puffer (TEA) pH 7,0 für 24 Stunden bei 28°C und 1400 Upm geschüttelt. Anschließend wurden die Ansätze mit 1 ml Dichlormethan extrahiert, zentrifugiert, mit Stickstoff getrocknet und in Acetonitril aufgenommen zur HPLC-Analyse gegeben.

[0058] Die Screeningergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

Stamm Nr.	Mikroorganismus	Umsetzung von Ethylsecodion nach 24 Stunden mit Wt Stämmen
		Ansatz 24 h
DSM 70362	<i>Pichia farinosa</i>	0,7 %
MUCL 29836	<i>Candida gropengiesseri</i>	0,2 %
CBS 7318	<i>Candida vaccinii</i>	3,2 %
DSM 3316	<i>Pichia farinosa</i>	15,8 %
CBS 1508	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,7 %
CBS 6396	<i>Candida magnoliae</i>	41 %

[0059] Der Stamm CBS 6396 zeigte die höchste Umsetzung von Ethylsecodion und wurde daher als Ausgangsorganismus für die Herstellung einer cDNA Bibliothek ausgesucht.

Beispiel 4

Herstellung einer cDNA Bibliothek aus *Candida magnoliae* CBS 6396 und Clonierung von Oxidoreduktase

A) Isolierung (gesamt und mRNA) sowie Herstellung der cDNA Bibliothek

[0060] 600 mg frische Zellen wurden in 2,5 ml eiskaltem LETS-Puffer resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden 5 ml (etwa 20 g) in Salpetersäure gewaschener Glasperlen, equilibriert mit 3 ml Phenol (pH 7,0), hinzugegeben. Der gesamte Ansatz wurde dann abwechselnd jeweils 30 sec Vortex, 30 sec Kühlen auf Eis insgesamt 10 min behandelt. Anschließend wurden 5 ml eiskalter LETS-Puffer hinzugegeben und nochmals kräftig mit Vortex gemischt. Diese Zellsuspension wurde für 5 min bei 11000 g bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde gewonnen und mit dem gleichen Volumen an Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1) zweimal extrahiert. Anschließend folgte die Extraktion mit Chloroform. Nach der letzten Extraktion wurde die Gesamt-RNA durch Zugabe von 1/10 Vol an 5 M LiCl₂ bei -20°C 4 h präzipitiert.

[0061] 1 mg so gewonnene Gesamt-RNA wurde über Oligo-dT Cellulose (NEB Biolabs) für die Anreicherung der mRNA-Moleküle benutzt. Nach der anschließenden Präzipitation wurden 5 µg mRNA für die cDNA Synthese (pBluescript IIXR cDNA Library Construction kit, Stratagene) verwendet. Die nach den Angaben des Herstellers konstruierte Bibliothek wurde in XL-10 Gold *E.coli* transformiert und auf die Aktivität einer ADH gescreent. Anhand der Extinktionsabnahme mit NADPH bzw. NADH als Cofaktor und Ethylsecodion (Formel III) als Substrat wurde ein Klon (cM4) identifiziert und isoliert. Die Sequenzierung des aus dem Klon isolierten Plasmids mit Primer T7 und Primer T3 resultierte in einer ORF von 789 bp. Dieses Fragment codierte für ein Fusionsprotein einer Größe von 262 Aminosäuren und bestand aus dem α-Fragment der β-Galactosidase und der Sequenz einer putativen short-chain Alkoholdehydrogenase.

B) Synthese eines für eine short-chain ADH aus *Candida magnoliae* CBS 6396 kodierenden Volllänge-Transkripts durch PCR

[0062] Es wurden spezifische Primer für eine nachfolgende Klonierung des Volllänge-Transkripts in die passenden Expressionssysteme konstruiert. Dabei wurde 5'-Primer mit einer Erkennungssequenz für *Nde I* bzw. *Sph I* und 3'-Primer mit einer Erkennungssequenz für *Xho I* bzw. *Sac I* modifiziert (SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17). Plasmid-DNA, isoliert aus dem Klon (cM4) der Expressionsbibliothek von *Candida magnoliae*, diente als Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion. Die Amplifizierung wurde in einem PCR-Puffer [10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM KCl; 10 mM MgSO₄; 1 mM dNTP Mix; je 20 pMol Primer und 2,5 U Platinum Pfx DNA-Polymerase (Invitrogen)] mit 50 ng Matrize und folgenden Temperatur-Zyklen durchgeführt:

Zyklus 1: 94°C, 2 min
 Zyklus 2 x 30: 94°C, 15 sec
 58°C, 30 sec
 68°C, 75 sec
 Zyklus 3: 68°C, 7 min
 4°C, ∞

[0063] Das resultierende PCR-Produkt wurde nach der Reinigung über ein 1 % Agarose-Gel mit Hilfe der Endonukleasen *Nde I* und *Xho I* bzw. der Endonucleasen *Sph I* und *Sac I* restringiert und in das mit gleichen Endonukleasen behandelte Rückgrad des pET21 a Vectors (Novagen) bzw. pQME70 Vectors ligiert. Nach der Transformation von 2 µl des Ligationsansatzes in *E. coli* Top 10 F' Zellen (Invitrogen) wurden Plasmid-DNAs Ampicillin-(bzw. Kanamycin)-resistenter Kolonien mittels einer Restriktionsanalyse mit den Endonukleasen *Nde I* und *Xho I* bzw. den Endonucleasen *Sph I* und *Sac I* auf das Vorhandensein eines 750 bp großen Inserts getestet. Die Expressionskonstrukte pET21-MgIV und pQME70-MgIV wurden sequenziert. Das für eine short-chain Oxidoreduktase codierende Gen aus *Candida mag-*
noliae besaß einen offenen Leserahmen von insgesamt 729 bp (in SEQ ID NO: 8 enthalten), das einem Protein von 243 Aminosäuren entsprach (SEQ ID NO:3)

Beispiel 5

Expression rekombinanter Oxidoreduktase in *E.coli* Zellen

[0064] Kompetente *Escherichia coli* StarBL21(De3)-Zellen (Invitrogen) bzw. RB791-Zellen (*E.coli* genetic stock, Yale, USA) wurden mit den für die Oxidoreduktase codierenden Expressionskonstrukten pET21-MgIV bzw. pQME70-MgIV transformiert. Die mit dem Expressionskonstrukten transformierten *Escherichia coli*-Kolonien wurden dann in 200 ml LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl) mit 50 µg/ml Ampicillin bzw. 40 µg/ml Kanamycin kultiviert, bis eine optische Dichte von 0,5, gemessen bei 550 nm, erreicht wurde. Die Expression von rekombinantem Protein wurde durch Zugabe von Isopropylthiogalaktosid (IPTG) in einer Konzentration von 0,1 mM induziert. Nach 16 Stunden Induktion bei 25°C und 220 Upm wurden die Zellen geerntet und bei -20°C eingefroren. Für den Aktivitätstest wurden 10 mg Zellen mit 500 µl 100 mM TEA Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂ und 500 µl Glasperlen versetzt und 10 min mittels einer Kugelmühle aufgeschlossen. Das erhaltene Lysat wurde dann verdünnt für die entsprechenden Messungen eingesetzt.

[0065] Der Aktivitätstest setzte sich wie folgt zusammen: 960 µl 100 mM TEA Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 160 µg NADPH, 10 µl verdünntes Zelllysate. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl einer 100 mM Substratlösung in 70 % Methanol zum Reaktionsgemisch gestartet.

[0066] Für die Enzymgewinnung in großen Mengen wurden 30 g Zellen in 150 ml Triethanolaminpuffer (100 mM, pH 7, 2 mM MgCl₂, 10 % Glycerin) resuspendiert und mittels Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Die Enzymlösung wurde anschließend mit 150 ml Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

Beispiel 6 (nicht erfindungsgemäß)

Reduktion von Ethylsecodion (Formel III) mittels Oxidoreduktase SEQ ID NO:1

[0067] Für die Reduktion von Ethylsecodion (Formel III) wurde in einem Reaktionsgefäß ein Gemisch aus 800 µl Puffer (100 mM Kaliumphosphat, pH = 7, 2 mM MgCl₂), 1,2 ml 2-Propanol, 0,08 mg NAD, 100 mg Ethylsecodion (Formel III) und 1 ml Enzymsuspension Oxidoreduktase SEQ ID NO:1 (siehe Beispiel 3) für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 96 h waren >90 % des eingesetzten Ethylsecodions (Formel III) reduziert.

[0068] Nach Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch durch Extraktion mit Dichlormethan aufgearbeitet, die das Produkt enthaltende organische Phase wurde abgetrennt und die 17-beta-Hydroxyverbindung (Ethylsecol) durch Abdampfen/Abdestillieren des Lösungsmittels gewonnen.

[0069] Die Umsetzung des Ethylsecodions zum Ethylsecol wurde mittels HPLC verfolgt. Hierzu wurde eine Trennsäule EC125/4 Nucleodur 100-5 C18ec (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) mit Acetonitril und Wasser als Laufmittel verwendet. Zur Analytik wurde ein linearer Gradient des Acetonitrilanteils im Laufmittel von 30 % auf 70 % angewendet. Die Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Vergleich mit Referenzsubstanzen.

Beispiel 7 (nicht erfindungsgemäß)Reduktion von Ethylsecodion (Formel III) mittels Oxidoreduktase SEQ ID NO:2

[0070] Für die Reduktion von Ethylsecodion (Formel III) wurde in einem Reaktionsgefäß ein Gemisch aus 250 µl Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 8, 2 mM MgCl₂), 250 µl 4-Methyl-2-pentanol, 0,02 mg NAD, 25 mg Ethylsecodion (Formel III) und 25 µl Enzymsuspension Oxidoreduktase SEQ ID NO:2 (siehe Beispiel 3) für 96 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 96 h waren >30 % des eingesetzten Ethylsecodions (Formel III) zur Hydroxyverbindung reduziert.

[0071] Nach Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch durch Extraktion mit Dichlormethan aufgearbeitet, die das Produkt enthaltende organische Phase wurde abgetrennt und die 17-beta-Hydroxyverbindung (Ethylsecol) durch Abdampfen/Abdestillieren des Lösungsmittels gewonnen.

Beispiel 8Reduktion von Ethylsecodion (Formel III) mittels Oxidoreduktase SEQ ID NO:3

[0072] Für die Reduktion von Ethylsecodion (Formel III) wurde in einem Reaktionsgefäß ein Gemisch aus 100 µl Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 2 mM MgCl₂), 400 µl 4-Methyl-2-pentanol, 0,02 mg NADP, 25 mg Ethylsecodion (Formel III) und 100 µl Enzymsuspension Oxidoreduktase SEQ ID NO:3 (siehe Beispiel 3) für 72 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 72 h waren >95 % des eingesetzten Ethylsecodions (Formel III) zur Hydroxyverbindung reduziert.

Beispiel 9 (nicht erfindungsgemäß)Reduktion von Ethylsecodion (Formel III) mittels Oxidoreduktase SEQ ID NO:4

[0073] Für die Reduktion von Ethylsecodion (Formel III) wurde in einem Reaktionsgefäß ein Gemisch aus 200 µl Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 9, 2 mM MgCl₂), 300 µl 2-Heptanol, 0,025 mg NADP, 100 mg Ethylsecodion (Formel III) und 50 µl Enzymsuspension Oxidoreduktase SEQ ID NO:4 (siehe Beispiel 3) für 72 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 72 h waren >80 % des eingesetzten Ethylsecodions (Formel III) zur Hydroxyverbindung reduziert.

Beispiel 10 (nicht erfindungsgemäß)Reduktion von Ethylsecodion (Formel III) mittels Oxidoreduktase SEQ ID NO:5

[0074] Für die Reduktion von Ethylsecodion (Formel III) wurde in einem Reaktionsgefäß ein Gemisch aus 300 µl Puffer (100 mM Triethanolamin, pH = 7, 2 mM MgCl₂), 1,2 ml 4-Methyl-2-pentanol, 0,12 mg NADP, 150 mg Ethylsecodion (Formel III) und 0,6 ml Enzymsuspension Oxidoreduktase SEQ ID NO:5 (siehe Beispiel 3) für 72 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 72 h waren >90 % des eingesetzten Ethylsecodions (Formel III) zur Hydroxyverbindung reduziert.

SEQUENCE LISTING

[0075]

<110> IEP GmbH

<120> Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion von Secodionderivaten

<130> I 12274A

<140> EP 11177932.8

<141> 2007-12-07

<160> 42

EP 2 410 047 B9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 252

<212> PRT

<213> Chloroflexus auratiacus

<400> 1

```

10      Met Glu Pro Pro Phe Ile Gly Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Ala
      1          5          10          15

15      Ala Gly Ile Gly Arg Ala Ser Ala Leu Ala Phe Ala Arg Glu Gly Ala
      20          25          30

20      Lys Val Val Val Ala Asp Val Asn Val Glu Gly Gly Glu Glu Thr Ile
      35          40          45

25      Ala Leu Cys Arg Ala Leu Asn Thr Asp Ala Met Phe Val Arg Cys Asp
      50          55          60

30      Val Ser Gln Arg Asp Glu Val Glu Arg Leu Ile Ala Leu Ala Val Asp
      65          70          75          80

35      Thr Phe Gly Arg Ile Asp Phe Ala His Asn Asn Ala Gly Ile Glu Gly
      85          90          95

40      Val Gln Ala Met Leu Ala Asp Tyr Pro Glu Glu Val Trp Asp Arg Val
      100          105          110

45      Ile Glu Ile Asn Leu Lys Gly Val Trp Leu Cys Met Lys Tyr Glu Ile
      115          120          125

50      Arg His Met Leu Lys Gln Gly Gly Gly Ala Ile Val Asn Thr Ser Ser
      130          135          140

55      Val Ala Gly Leu Ala Gly Ser Arg Gly Val Ser Ala Tyr Val Ala Ser
      145          150          155          160

      Lys His Gly Ile Val Gly Ile Thr Lys Ala Ala Ala Leu Glu Tyr Ala
      165          170          175

```

EP 2 410 047 B9

	Arg	Asn	Gly	Ile	Arg	Val	Asn	Ala	Ile	Cys	Pro	Gly	Thr	Ile	His	Thr
				180					185					190		
5	Ala	Met	Ile	Asp	Arg	Phe	Thr	Gln	Gly	Asp	Pro	Gln	Leu	Leu	Ala	Gln
			195					200					205			
10	Phe	Ala	Glu	Gly	Glu	Pro	Ile	Gly	Arg	Leu	Gly	Ser	Pro	Glu	Glu	Val
	210						215					220				
15	Ala	Asn	Ala	Val	Ile	Trp	Leu	Cys	Ser	Asp	Lys	Ala	Ser	Phe	Val	Thr
	225					230					235					240
	Gly	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Asp	Gly	Gly	Arg	Leu	Ala				
					245					250						
20	<210> 2															
	<211> 249															
	<212> PRT															
	<213> Rubrobacter xylanophilus															
25	<400> 2															
30																
35																
40																
45																
50																
55																

EP 2 410 047 B9

	Met	Leu	Glu	Gly	Lys	Val	Ala	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Ile	
	1				5					10					15		
5	Gly	Arg	Ala	Thr	Ala	Leu	Lys	Phe	Ala	Arg	Glu	Gly	Ala	Arg	Val	Val	
				20					25					30			
10	Ala	Ala	Glu	Leu	Asp	Glu	Arg	Gly	Gly	Glu	Gly	Val	Val	Arg	Glu	Val	
			35					40					45				
15	Arg	Ser	Leu	Gly	Gly	Glu	Ala	Val	Phe	Val	Arg	Thr	Asp	Val	Ser	Glu	
		50					55					60					
20	Phe	Ala	Gln	Val	Glu	Asp	Ala	Val	Glu	Arg	Ala	Val	Gly	Glu	Tyr	Gly	
	65					70					75					80	
25	Thr	Leu	Asp	Val	Met	Phe	Asn	Asn	Ala	Gly	Ile	Gly	His	Tyr	Ala	Pro	
					85					90					95		
30	Leu	Leu	Glu	His	Glu	Pro	Glu	His	Tyr	Asp	Arg	Val	Val	Arg	Val	Asn	
				100					105					110			
35	Gln	Tyr	Gly	Val	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Leu	Ala	Ala	Gly	Arg	Lys	Met	Val	
			115					120					125				
40	Ala	Leu	Lys	Asn	Pro	Gly	Leu	Ile	Ile	Asn	Thr	Ala	Ser	Val	Tyr	Ala	
			130				135					140					

EP 2 410 047 B9

	Phe	Leu	Ala	Ser	Pro	Gly	Val	Ile	Gly	Tyr	His	Ala	Ala	Lys	Gly	Ala	
	145					150					155					160	
5	Val	Lys	Met	Met	Thr	Gln	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	Leu	Ala	Pro	His	Gly	
					165					170					175		
10	Ile	Arg	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Pro	Gly	Gly	Val	Asp	Thr	Pro	Ile	Ile	
				180					185					190			
15	Gln	Gly	Tyr	Lys	Asp	Met	Gly	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	Arg	Gly	Gln	
			195					200					205				
20	Met	Arg	Arg	Arg	Leu	Gln	Thr	Pro	Glu	Gln	Ile	Ala	Gly	Ala	Val	Ala	
	210						215					220					
25	Leu	Leu	Ala	Thr	Asp	Glu	Ala	Asp	Ala	Ile	Asn	Gly	Ser	Val	Val	Met	
	225					230					235					240	
30	Thr	Asp	Asp	Gly	Tyr	Ala	Glu	Phe	Lys								
					245												

<210> 3

<211> 243

<212> PRT

<213> Candida magnoliae

<400> 3

EP 2 410 047 B9

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

EP 2 410 047 B9

<210> 4
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Candida magnoliae

5

<400> 4

10

Met Thr Ser Thr Pro Asn Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15

15

Gly Ala Ser Ala Ala Ile Lys Leu Ala Gln Glu Gly Tyr Ser Val Thr
 20 25 30

20

Leu Ala Ser Arg Asp Leu Glu Lys Leu Thr Glu Val Lys Asp Lys Leu
 35 40 45

25

Pro Ile Val Arg Gly Gly Gln Lys His Tyr Val Trp Gln Leu Asp Leu
 50 55 60

Ala Asp Val Glu Ala Ala Ser Ser Phe Lys Ala Ala Pro Leu Pro Ala
 65 70 75 80

30

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

35

40

45

50

55

EP 2 410 047 B9

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

<210> 5

<211> 241

<212> PRT

<213> Candida magnoliae

<400> 5

EP 2 410 047 B9

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

EP 2 410 047 B9

<210> 6
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> Chloroflexus aurantiacus

5
 <400> 6

10
 atggagccac ctttcattgg gaagggtgcg ctggtcaccg gcgcagcagc cggatttggt 60
 cgtgcttcag cactggcggtt tgcccgtgag ggtgcccaagg ttgtcgttgc tgatgtgaat 120
 gtcgagggcg gggaagagac gattgcgctg tgtcgggctt tgaataccga tgcaatgttc 180
 gtgcggttggt atgtttcgca acgcgatgaa gtggagcgat taattgctct ggcagttgac 240
 acgttcgggc ggatcgactt tgcgcacaac aacgccggga ttgaaggcgt gcaggcaatg 300
 ctggccgatt atcccgaaga ggtctgggat cgggtgatcg agatcaacct caaaggggtc 360
 20
 tggttgtgta tgaagtacga aatccggcac atgctcaagc aggggtggcgg tgcgattgtg 420
 aatacctcat cggtcgccgg tctggccgga tcacgtggcg tttcggcgta tgtagccagc 480
 aagcacggta ttgttggtat taccaaagcg gcagcccttg agtatgcgcg taacggtatt 540
 cgtgtcaacg caatctgtcc aggtacgatt catactgcga tgatcgaccg ctttaccag 600
 ggtgatcccc aactgcttgc ccagttcgct gaggggtgaac cgattggtcg gctcggctcg 660
 30
 cctgaagagg tcgccaatgc ggtgatctgg ctctgctcag ataaggcttc gtttgtgacc 720
 ggagcgacac tggcgggttga tgggtggccgc ctggcgtaa 759

<210> 7
 <211> 750
 <212> DNA
 <213> Rubrobacter xylanophilus

35
 <400> 7

40

45

50

55

EP 2 410 047 B9

	atgctcgagg ggaaggtcgc ggtcatcacg ggggccggaa gcggcatagg ccggggccacc	60
	gcgctcaagt tcgcccgcga gggggcccgg gtcgtcgccg ccgagctcga cgagcgcggc	120
5	ggggaggggg tgggccggga ggtgcgcagc ctcggggggcg aggcgggtctt cgtccggacc	180
	gacgtctcgg agttcgcgca ggtggaggac gccgtcgagc gggcggtcgg ggagtacggc	240
10	accctcgacg tgatgttcaa caacgccggc atcggggcact acgccccct gctggagcac	300
	gagcccagac actacgaccg ggtgggtccgg gtgaaccagt acggcgtcta ctacgggata	360
	ctcgcccgcg ggagaaagat ggtcgccctg aagaaccccg gcttgatcat caacaccgcc	420
15	tcgggtctacg ccttcctcgc ctcgccgggg gtcatcggct accacgccgc caagggggcg	480
	gtcaagatga tgaccagggc ggcggcgctg gagctcgccc cgcacggcat aagggtcgtc	540
	gccatcgccc cgggcgggggt ggacaccccc atcatccagg gctacaagga catggggctc	600
20	ggcgagaggc tggcccgcgg ccagatgcgc cgccggctcc agacccccga gcagatcgcc	660
	ggggcggtcg ccctgctcgc caccgacgag gccgacgcca taaacggctc ggtggtcatg	720
25	accgacgacg gctacgcgga gttcaagtag	750
	<210> 8	
	<211> 732	
	<212> DNA	
	<213> Canadida magnoliae	
30	<400> 8	
	atgtctgcta cttcgaacgc tcttatcact ggtgccagcc gcggaatggg cgaggccaca	60
35	gctattaagc ttgcccttga ggggtacagc gtcacccttg catcacgcgg tattgagcag	120
	ctcaatgcc a tcaaggaaaa actaccatc gtgaagaagg gccagcagca ctacgtttgg	180
40	cagctcgatc ttagtgacat cgaggcggct tccaccttca agggggctcc tctgcctgcc	240
	agcagctacg acgtgttctt cagcaacgcc ggtgtgggtg actttgctcc gttcgcagac	300
	caaagcgaga ctgcgcaaaa ggacctgttc acggttaacc tgctgtcgcc tgttgcggtg	360
45	accaagacca ttgttaaggc catcgccgac aagccccgcg agacgcctgc tcacattatc	420
	ttcacctcgt ccattgtcgg aattcgcggt gttcccaacg tggcgggtcta cagcgccacc	480
50	aagggcgcga ttgacagctt tgccgcgtcg cttgctcgtg agttcgggtcc caagaacatc	540
	cacgttaact gcgtgaaccc gggcacgacg cgcaccgaga tgacaaagg cgttgatctc	600
	gcggcctttcg gcgatgttcc tatcaagggc tggatcgagg tcgatgcgat tgccgacgct	660
55	gtgctgtttt tgatcaagtc caagaacatc actggccagt cgctcgttgt tgacaacgga	720
	ttcgggtgtt aa	732

EP 2 410 047 B9

<210> 9
 <211> 726
 <212> DNA
 <213> Candida magnoliae

5

<400> 9

	atgacatcta cacctaatagc cctcatcacg ggaggcagcc gcggcattgg cgcttccgcc	60
10	gccatcaaac tggctcaaga agggtagacg gtcacgctgg cgtcccgcga ccttgagaaa	120
	cttactgagg tcaaggacaa gctgccaatc gtgagaggtg gacagaaaca ctacgtttgg	180
	cagctcgatc ttgccgatgt ggaggctgca tcgtctttca aggcggctcc tctgccggcc	240
15	agcagctacg atttgtttgt ttcgaacgcc ggaattgccc agttctcgcc tacggcagag	300
	catactaata gtgagtggct gaacattatg accattaact tagtgtcccc gattgccttg	360
20	acgaaggctc ttttgcaggc cgtttctggg aggtcgagcg agaaccggtt tcagatcgtc	420
	ttcatctcgt cggttgcagc actacgtggc gttgcacaaa cggccgtcta cagtgcgtcg	480
	aaggctggta ctgatggatt cgcacgctca cttgctcgcg aactaggtcc tcaaggtggt	540
25	catgtgaacg tgggtgaacc tggctggact aagacagaca tgacggaagg agtcgaaacc	600
	ccaaaggaca tgcccattaa gggctggatc cagcctgagg caattgctga tgctgtagta	660
30	ttccttgcca ggctcgaaaaa cattaccggc gcgaatattg tagtggacaa tggtttctcg	720
	acgtaa	726

<210> 10
 <211> 726
 <212> DNA
 <213> Candida magnoliae

35

<400> 10

40	atgacgacta cttcaaacgc gcttgtcact ggaggcagcc gcggcattgg cgctgcctcc	60
	gccattaagc tggctcagga gggctacaat gttacgctgg cctctcgag tgttgataaa	120
	ctgaatgaag taaaggcgaa actcccaatt gtacaggacg ggcagaagca ctacatttgg	180
45	gaactcgatc tggctgatgt ggaagctgct tcgtcgttca aggggtgctcc tttgcctgct	240
	cgcagctacg acgtctttgt ttcgaacgcg ggcgtcgctg cgttctcgcc cacagccgac	300
50	cacgatgata aggagtggca gaacttgctt gccgtgaact tgtcgctgcc cattgccttc	360

55

EP 2 410 047 B9

	acgaaggccc tcttgaagga tgtctccgaa aggcctgtgg acaagccact gcagattatc	420
	tacatttcgt cgggtggccgg cttgcatggc gccgcgcagg tcgccgtgta cagtgcattc	480
5	aaggccggtc ttgatgggtt tatgctctcc gtcgcccgtg aggtgggccc gaagggcatc	540
	catgtgaact ccatcaaccc cggatacacg aagactgaaa tgaccgcggg cattgaagcc	600
10	cttcctgatt tgcctatcaa ggggtggatc gagcccagg caattgctga cgcggttctg	660
	tttctggcaa agtccaagaa tatcaccggc acaaacattg tggtcgacaa tggcttgatt	720
	gcttaa	726
15	<210> 11 <211> 38 <212> DNA <213> künstliche Sequenz	
20	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(38) <223> Primer für Klonierung von Oxidoreduktasegen SEQ ID NO: 6 aus Chloroflexus aurantiacus in Expressionsvektor	
25	<400> 11 ggaattccat atgatggagc caccttcat tgggaagg 38	
30	<210> 12 <211> 34 <212> DNA <213> künstliche Sequenz	
35	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(34) <223> Primer für Klonierung von Oxidoreduktasegen SEQ ID NO: 6 aus Chloroflexus aurantiacus in Expressionsvektor	
40	<400> 12 cccaagctta ttattacgcc aggcggccac catc 34	
45	<210> 13 <211> 38 <212> DNA <213> künstliche Sequenz	
50	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(38) <223> Primer für Klonierung von Oxidoreduktasegen SEQ ID NO: 6 aus Chloroflexus aurantiacus in Expressionsvektor	
55	<400> 13 cacatgcatg cagatggagc caccttcat tgggaagg 38	
	<210> 14 <211> 35	

<212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> Primer für Klonierung von Oxidoreduktasegen SEQ ID NO: 8 aus Candida magnoliae in Expressionsvektor

 <400> 14
 10 ggaattccat atgatgtctg ctacttcgaa cgctc 35

 <210> 15
 <211> 33
 <212> DNA
 15 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(33)
 20 <223> Primer für Klonierung von Oxidoreduktasegen SEQ ID NO: 8 aus Candida magnoliae in Expressionsvektor

 <400> 15
 ccgctcgagt tattaaacac cgaatccgtt gtc 33

 25 <210> 16
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> Primer für Klonierung von Oxidoreduktasegen SEQ ID NO: 8 aus Candida magnoliae in Expressionsvektor

 35 <400> 16
 cacatgcatg cagatgtctg ctacttcgaa cgctc 35

 <210> 17
 <211> 34
 40 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (1)..(34)
 <223> Primer für Klonierung von Oxidoreduktasegen SEQ ID NO: 8 aus Candida magnoliae in Expressionsvektor

 <400> 17
 50 gcccgagctc ttattaaaca ccgaatccgt tgc 34

 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

 55 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(12)

<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

<400> 18

5
Asn Ala Leu Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly Ile Gly
1 5 10

<210> 19

10 <211> 12

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

15 <221> PEPTIDE

<222> (1) . . (12)

<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

<400> 19

20
Asn Ala Leu Val Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile Gly
1 5 10

25 <210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

30 <221> PEPTIDE

<222> (1)..(12)

<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

<400> 20

35
Asn Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile Gly
1 5 10

40
<210> 21
<211> 12

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

45 <221> PEPTIDE

<222> (1)..(12)

<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

<400> 21

50
55
Asn Ala Leu Ile Thr Gly Ala Ser Arg Gly Ile Gly
1 5 10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 5 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(12)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

 <400> 22
 10

 Asn Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ser Arg Gly Met Gly
 1 5 10

 15 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

 20 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(12)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

 25 <400> 23

 His Ala Leu Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly Ile Gly
 1 5 10

 30 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

 35 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(7)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

 40 <400> 24

 Gly Tyr Ser Val Thr Leu Ala
 45 1 5

 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 50 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(7)
 55 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

 <400> 25

EP 2 410 047 B9

Gly Tyr Asn Val Thr Leu Ala
1 5

5 <210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

10 <220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(7)
<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

15 <400> 26

Gly Tyr Ser Val Thr Leu Val
1 5

20 <210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

25 <220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(7)
<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

30 <400> 27

Gly Tyr Asn Val Thr Leu Val
1 5

35 <210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

40 <220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(8)
<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz
45 <400> 28

Phe Lys Gly Ala Pro Leu Pro Ala
1 5

50 <210> 29
<211> 8
55 <212> PRT
<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> PEPTIDE
 <222> (1)..(8)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

5 <400> 29

Phe Lys Ala Ala Pro Leu Pro Ala
 1 5

10

<210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

15

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(6)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

20

<400> 30

Phe Val Ser Asn Ala Gly
 1 5

25

<210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

30

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(6)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

35

<400> 31

Phe Phe Ser Asn Ala Gly
 1 5

40

<210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

45

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(6)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

50

<400> 32

55

Phe Val Cys Asn Ala Gly
 1 5

5
 <210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(6)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz
 10
 <400> 33

 Phe Val Ala Asn Ala Gly
 15 1 5

 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> künstliche Sequenz
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(9)
 25 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz
 <400> 34

 Ser Pro Ile Ala Leu Thr Lys Ala Leu
 30 1 5

 <210> 35
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz
 <220>
 <221> PEPTIDE
 40 <222> (1)..(9)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz
 <400> 35

 45 Ser Pro Val Ala Leu Thr Lys Thr Ile
 1 5

 <210> 36
 50 <211> 9
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz
 <220>
 55 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(9)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

EP 2 410 047 B9

<400> 36

Ser Pro Ile Ala Leu Thr Lys Thr Leu

<210> 37

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

10 <213> künstliche Sequenz

$\langle 220 \rangle$

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(9)

15 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

<400> 37

20 Ser Pro Val Ala Met Thr Lys Ala Leu
 1 5

<210> 38

<211> 9

25 <212> PRT

<213> künstliche Sequenz

$\langle 220 \rangle$

<221> PEPTIDE

30 <222> (1)..(9)

<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

<400> 38

35 Ser Gln Ile Ala Leu Thr Lys Ala Leu
 1 5

<210> 39

40 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

 $\langle 220 \rangle$

45 <221> PEPTIDE

<222> (1)..(7)

<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

<400> 39

50

Ala Val Tyr Ser Ala Ser Lys
1 5

$\langle 210 \rangle$ 40

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(7)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

5

<400> 40

Ala Val Tyr Ser Ala Thr Lys
 1 5

10

<210> 41
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

15

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(6)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

20

<400> 41

Pro Ile Lys Gly Trp Ile
 1 5

25

<210> 42
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

30

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(6)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

35

<400> 42

Pro Ile Ser Gly Trp Ile
 1 5

40

Patentansprüche

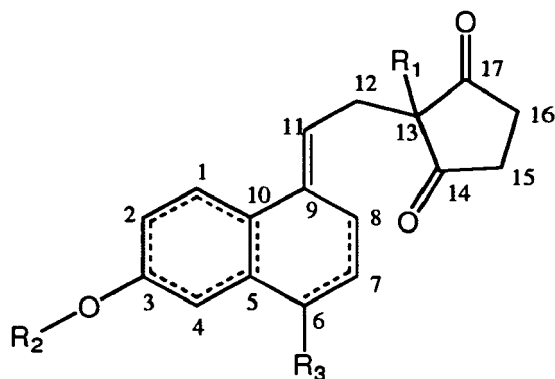
1. Polypeptid mit Oxidoreduktaseaktivität, welches

- a) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3 aufweist oder
- b) von der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:8 kodiert wird und Secodionderivate der allgemeinen Formel I

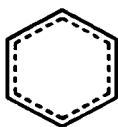
50

55

(I)



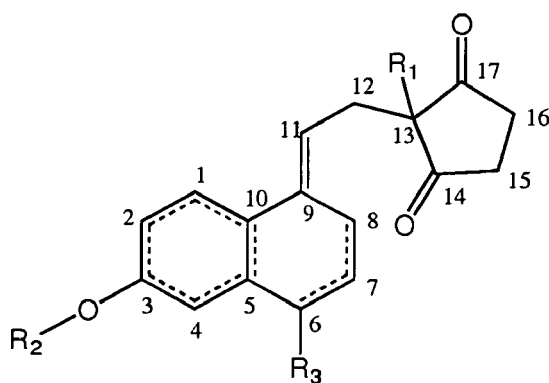
worin die Ringstrukturen kein, ein oder mehrere Heteroatome umfassen,
 R_1 Wasserstoff oder eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe ist,
 R_2 Wasserstoff, eine C_1 - C_8 -Alkylgruppe oder eine OH-Schutzgruppe, wie ein Ester, ist,
 R_3 Wasserstoff, eine Methylgruppe oder ein Halogenid ist,
 das Strukturelement



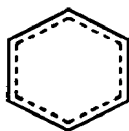
einen Benzolring oder einen C_6 -Ring mit 0, 1 oder 2 C-C-Doppelbindungen repräsentiert, an den Positionen 6/7 oder 7/8 gegebenenfalls eine Doppelbindung enthalten ist und der Kohlenstoff an den Positionen 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 und 16 unabhängig mit Wasserstoff, einer C_1 - C_4 -Alkylgruppe, einem Halogenid oder einer Phenylgruppe substituiert ist, in Gegenwart von NADH oder NADPH als Cofactor reduziert.

2. Polypeptid mit Oxidoreduktaseaktivität, welches Secodionderivate der allgemeinen Formel I

(I)



worin die Ringstrukturen kein, ein oder mehrere Heteroatome umfassen,
 R_1 Wasserstoff oder eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe ist,
 R_2 Wasserstoff, eine C_1 - C_8 -Alkylgruppe oder OH-Schutzgruppe, wie ein Ester, ist,
 R_3 Wasserstoff, eine Methylgruppe oder ein Halogenid ist,
 das Strukturelement



einen Benzolring oder einen C₆-Ring mit 0, 1 oder 2 C-C-Doppelbindungen repräsentiert, an den Positionen 6/7 oder 7/8 gegebenenfalls eine Doppelbindung enthalten ist und der Kohlenstoff an den Positionen 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 und 16 unabhängig mit Wasserstoff, einer C₁-C₄-Alkylgruppe, einem Halogenid oder einer Phenylgruppe substituiert ist,

in Gegenwart von NADH oder NADPH als Cofactor reduziert und von einer Nukleinsäuresequenz kodiert wird, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:8 zumindest 80% Identität aufweist und unter stringenten Bedingungen hybridisiert, wobei die stringenten Bedingungen die Hybridisierung in 0.7-1 M NaCl-Lösung bei 60°C umfassen.

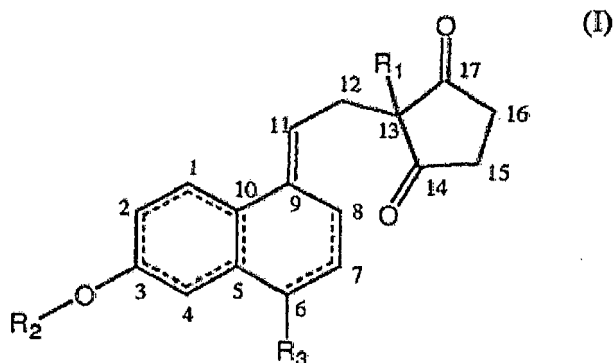
3. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, erhältlich aus *Candida magnoliae* CBS 6396.

Claims

1. Polypeptide having oxidoreductase activity which

a) has the amino acid sequence SEQ ID NO: 3 or

b) is encoded by the nucleic acid sequence SEQ ID NO: 8 and reduces secodione derivatives of the general formula I



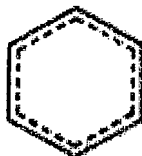
where the ring structures comprise no, one or a plurality of heteroatoms,

R₁ is hydrogen or a C₁-C₄ alkyl group,

R₂ is hydrogen, a C₁-C₈ alkyl group or an OH- protecting group, such as an ester,

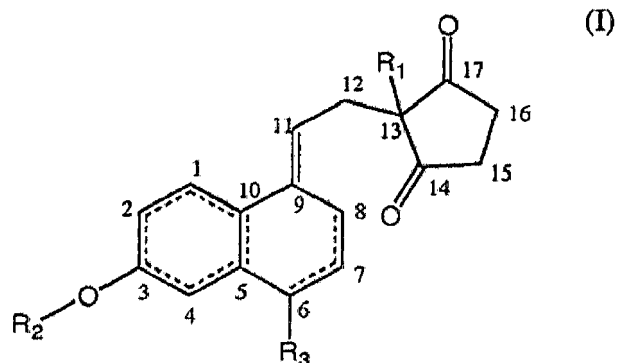
R₃ is hydrogen, a methyl group or a halide,

the structural element

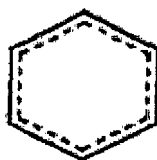


represents a benzene ring or a C₆ ring having 0, 1 or 2 C-C double bonds, optionally at the positions 6/7 or 7/8 a double bond is present and the carbon at the positions 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 and 16 is independently substituted with hydrogen, a C₁-C₄ alkyl group, a halide or a phenyl group, in the presence of NADH or NADPH as cofactor.

2. Polypeptide having oxidoreductase activity which reduces secodione derivatives of the general formula I



where the ring structures comprise no, one or a plurality of heteroatoms,
 R_1 is hydrogen or a C_1 - C_4 alkyl group,
 R_2 is hydrogen, a C_1 - C_8 alkyl group or OH- protecting group, such as an ester,
 R_3 is hydrogen, a methyl group or a halide,
 the structural element



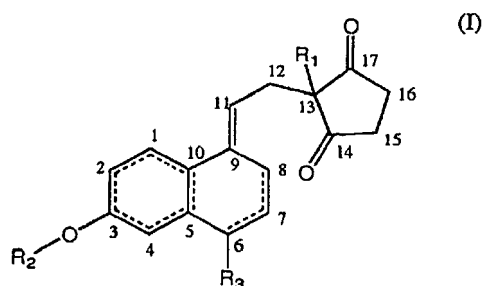
represents a benzene ring or a C_6 ring having 0, 1 or 2 C-C double bonds, optionally at the positions 6/7 or 7/8 a double bond is present and the carbon at the positions 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 and 16 is independently substituted with hydrogen, a C_1 - C_4 alkyl group, a halide or a phenyl group, in the presence of NADH or NADPH as cofactor and is encoded by a nucleic acid sequence which has at least 80 % identity with the nucleic acid sequence SEQ ID NO: 8 and hybridizes under stringent conditions, wherein the stringent conditions comprise hybridization in 0.7-1 M NaCl solution at 60 °C.

3. Isolated polypeptide according to Claim 1 or 2, obtainable from *Candida magnoliae* CBS 6396.

Revendications

1. Polypeptide avec une activité d'oxydoréductase, qui :

- a) présente la séquence d'acides aminés SEQ ID NO :3 ou
- b) est codé par la séquence d'acide nucléique SEQ ID NO :8 et réduit des dérivés de sécodione de formule générale I :

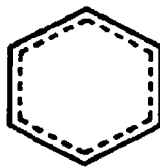


où les structures cycliques ne comprennent pas d'hétéroatomes ou en présentent un ou plusieurs,

R_1 est de l'hydrogène ou un groupe alkyle en C_1-C_4 ,

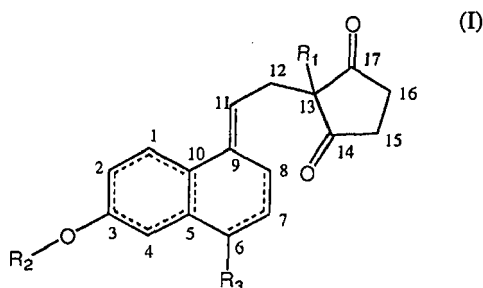
R_2 est de l'hydrogène, un groupement alkyle en C_1-C_8 ou un groupement de protection de OH, tel qu'un ester,

R_3 est de l'hydrogène, un groupement méthyle ou un halogénure, l'élément structurel :



représente un cycle de benzène ou un cycle en C_6 avec 0, 1 ou 2 doubles liaisons C-C, une double liaison est contenue éventuellement dans les positions 6/7 ou 7/8 et le carbone est substitué dans les positions 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 et 16 indépendamment par de l'hydrogène, un groupement alkyle en C_1-C_4 , un halogénure ou un groupement phényle, en présence de NADH ou de NADPH comme cofacteurs.

2. Polypeptide avec une activité d'oxydoréductase, qui réduit des dérivés de sécodione de formule générale I :

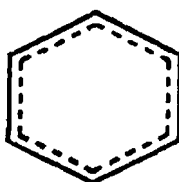


où les structures cycliques ne comprennent pas d'hétéroatomes ou en comprennent un ou plusieurs,

R_1 est de l'hydrogène ou un groupement alkyle en C_1-C_4 ,

R_2 est de l'hydrogène, un groupement alkyle en C_1-C_8 ou un groupement de protection de OH, tel qu'un ester,

R_3 est de l'hydrogène, un groupement méthyle ou un halogénure, l'élément structurel :



représente un cycle de benzène ou un cycle en C_6 avec 0, 1 ou 2 doubles liaisons C-C, une double liaison est éventuellement présente dans les positions 6/7 ou 7/8 et le carbone est substitué dans les positions 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 et 16 indépendamment par de l'hydrogène, un groupement alkyle en C_1-C_4 , un halogénure ou un groupement phényle, en présence de NADH ou de NADPH comme cofacteurs et est codé par une séquence d'acide nucléique, qui présente une identité d'au moins 80% avec la séquence d'acide nucléique SEQ ID NO :8 et est hybridée dans des conditions stringentes, dans lequel les conditions stringentes comprennent l'hybridation dans 0,7 à 1 M de solution de NaCl à 60°C.

3. Polypeptide isolé selon la revendication 1 ou la revendication 2, qui peut être tiré de la souche *Candida magnoliae* CBS 6396.

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- US 3616226 A [0007]
- US 1252524 A [0007]
- US 3616225 A [0007]
- US 3697379 A [0010]
- EP 1152054 B1 [0012]
- US 5523223 A [0035]
- US 5763236 A [0035]
- DE 10327454 [0035]
- US 5200335 A [0036]
- DE 19610984 A1 [0036]
- DE 10119274 [0036]
- EP 11177932 A [0075]

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **KOSMOL et al.** *Liebigs Ann. Chem.*, 1967, vol. 701, 199 [0008]
- *Acta microbiol. Acad. Sci. hung.*, 1975, vol. 22, 463-471 [0008]
- *Current Science*, 05. Februar 1984, vol. 53 (3), 124 [0010]
- *Indian Journal of Experimental Biology*, 27. August 1989, 742-743 [0010]
- *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0023]
- *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, vol. 15 (11), 950-8 [0035]
- *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999, vol. 63 (10), 1721-1729 [0035]
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, vol. 62 (4), 380-6 [0035]
- *J. Org. Chem.*, 2003, vol. 68 (2), 402-6 [0035]
- *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, Dezember 2000, vol. 56, 1696-8 [0036]
- **TISHKOV et al.** *J. Biotechnol. Bioeng.*, 1999, vol. 64, 187-193 [0037]