



(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)
C12P 33/00 (2006.01)

C12N 9/04 (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 Secodiononderivaten**

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

- Dupont, Maria**
50354 Hürth (DE)

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

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

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

25.01.2012 Patentblatt 2012/04

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

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)
nach Art. 76 EPÜ:

07856445.7 / 2 087 127

- 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,**

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

(72) Erfinder:

- Gupta, Antje**
65207 Wiesbaden (DE)
- Tschentscher, Anke**
65347 Eltville - Hattenheim (DE)

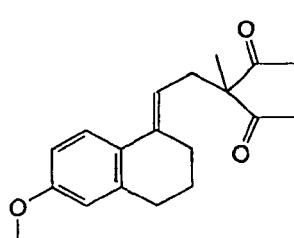
Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt,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

Beschreibung

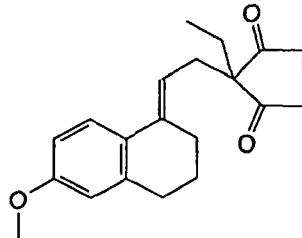
[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Oxidoreduktase für die enantioselektive enzymatische Reduktion von Secodionederivaten der allgemeinen Formel I, wobei das Secodionederivat mit einer Oxidoreduktase/Dehydrogenase in Gegenwart von NADH oder NADPH als Cofaktor reduziert wird.

[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.

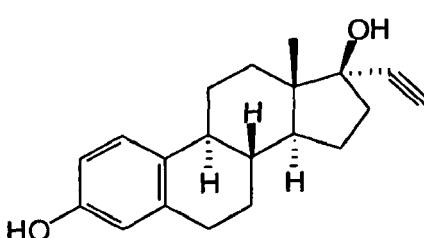
[0003] Schlüsselbausteine der Totalsynthese von enantiomerenreinen Steroiden sind dabei Verbindungen der allgemeinen Formel I, welche auch als Secosteroide, 8,14-seco-gona-tetraen-14,17-dione oder Secodione bezeichnet werden. Spezielle Vertreter dieser Gruppe sind zum Beispiel die Verbindungen Methylsecodion (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.



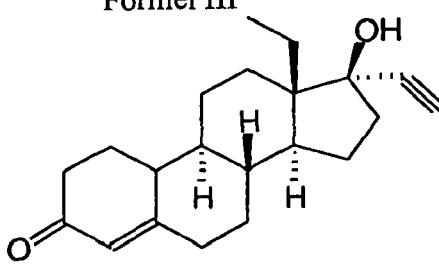
Formel II



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 Zykлизierung unter Erhalt der Chiralität zu chiralen Steroidverbindungen weiterverarbeitet werden.

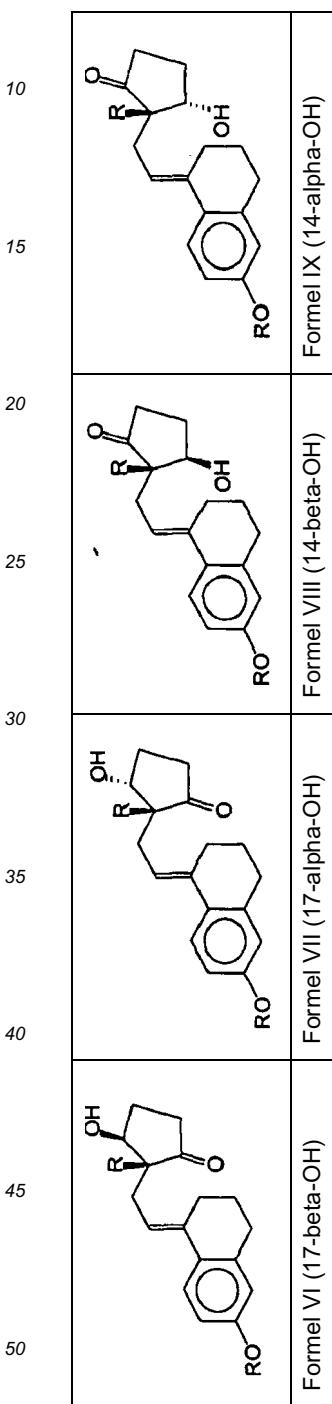
[0005] Durch enantioselektive Reduktion einer Ketogruppe der Verbindung der Formel I können theoretisch vier optisch aktive Verbindungen gebildet werden (Formeln VI bis IX).

45

50

55

5



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 Secodionederivaten 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 drosophilicola* 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.

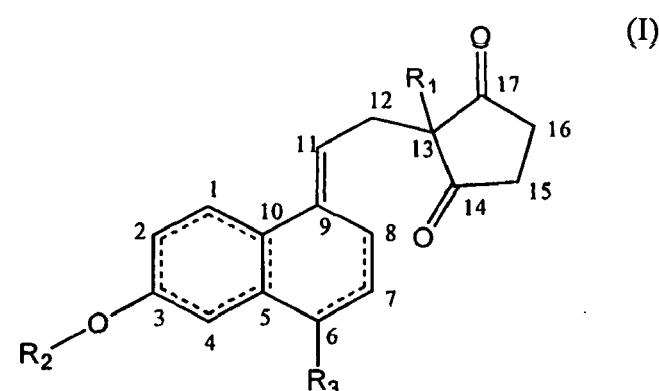
[0010] Die stereoselektive Reduktion der Secodionederivate wird dabei bis heute als Ganzzellbiotransformation mittels verschiedener Hefestämme der Gattung *Pichia* oder *Saccharomyces* durchgeführt. Diese Verfahren besitzen jedoch den Nachteil, dass nur sehr geringe Substratkonzentrationen von weit unter 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 Secodionederivaten 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 Secodionederivate 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 Schutzmfang 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 Secodionederivaten der allgemeinen Formel I gelöst,

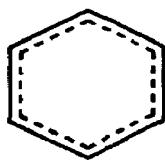


worin die Ringstrukturen kein, ein oder mehrere Heteroatome umfassen,

- 55 R₁ Wasserstoff oder eine C₁-C₄-Alkylgruppe ist,
 R₂ Wasserstoff, eine C₁-C₈-Alkylgruppe oder eine OH- Schutzgruppe, wie ein Ester, ist,
 R₃ 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 Cofaktor reduziert.
- 15 [0015] Das Secodionderivat wird in einer Konzentration von >10 g/l im Reaktionsansatz eingesetzt und der durch die Oxidoreduktase/Dehydrogenase gebildete oxidierte Cofaktor 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 Cofaktor 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.
- 40 [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.
- 45 [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.
- 50 [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 Cofaktor 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]

5 nalvtgasrig, nalvtggsgrig, nalitggsgrig, nalitgasrig, halvtgasrig,

10 gysvtla, gynvtla, gysvtlv, gynvtlv,

fkgaplapa, fkaaplapa,

fvsnag, ffsnag, fvcnag, fvanag,

spialtkal, spvaltkti, spialtktl, spvamtkal, sqialtkal,

avysask, avysatk,

15 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 Cofaktor NAD oder NADP kontinuierlich regeneriert wird, weist die Oxidoreduktase/Dehydrogenase

25 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 Cofaktor 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] nalvtgasrig, nalvtggsgrig, nalitggsgrig, nalitgasrig, nalitggsgmg, halvtgasrig, gysvtla, gynvtla, gysvtlv, fkgaplapa, fkaaplapa, fvsnag, ffsnag, fvcnag, fvanag, spialtkal, spvaltkti, spvamtkal, 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 Cofaktor NAD oder NADP kontinuierlich regeneriert.

[0031] Gemäß einer Ausführungsform der Verfahren wird der oxidierte Cofaktor 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 $R_X R_Y CHOH$ 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 *Thermoanerobium brockii*, *Thermoanerobium 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 Cofaktor) 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, Cofaktor 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-Dithiothreit (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 500g/l, bevorzugt von 25g/l bis 300g/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.

45 Beispiel 1 (nicht erfindungsgemäß)

Klonierung einer Oxidoreduktase aus *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635

A) Anzucht von *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635

- [0050] Zellen von *Chloroflexus aurantiacus* 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 $\mu\text{l/l}$ 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 Maniatis & Sambrook beschriebenen Methode extrahiert. Die resultierende Nukleinsäure diente als Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen

5 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 Restriktionschnittstellen 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 genommischer DNA und 10 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, ∞

20 [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* restriktiert 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 25 *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, 35 gemessen bei 550 nm, erreicht wurde. Die Expression von rekombinantern Protein wurde durch Zugabe von Isopropyl-1-thiogalaktosid (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.

40 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 Zelllysat. 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 45 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 Hydroxysecoesteroidverbindung 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.

5

[0058] Die Screeningergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

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

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

25 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 II XR 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 a-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 *Xba 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
5		68°C, 75 sec
	Zyklus 3:	68°C, 7 min
		4°C, ∞

10 [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 Endonukleasen *Sph* I und *Sac* I restriktiert 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 *Xhol* bzw. den Endonukleasen *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 magnoliae* 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)

20 Beispiel 5

Expression rekombinanter Oxidoreduktase in *E.coli* Zellen

25 [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 Expressionskonstrukt 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.

30 [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 Zellysat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl einer 100 mM Substratlösung in 70 % Methanol zum Reaktionsgemisch gestartet.

35 [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.

40 Beispiel 6 (nicht erfindungsgemäß)

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

45 [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.

50 [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.

55 [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

- 5 [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.
- 10 [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

- 15 [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

- 25 [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

- 35 [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

45 [0075]

<110> IEP GmbH

50 <120> Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion von Secodionderivaten

<130> I 12274A

55 <140> EP 11177932.8

<141> 2007-12-07

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 252

5 <212> PRT

<213> Chloroflexus aurantiacus

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

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

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

45

50

55

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

Met Arg Arg Arg Leu Gln Thr Pro Glu Gln Ile Ala Gly Ala Val Ala
210 215 220

20 Leu Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Ala Ile Asn Gly Ser Val Val Met
225 230 235 240

25 Thr Asp Asp Gly Tyr Ala Glu Phe Lys
245

<210> 3

<211> 243

<212> PRT

30 <213> Candida magnoliae

<400> 3

35

40

45

50

55

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

Ser Asp Ile Glu Ala Ala Ser Thr Phe Lys Gly Ala Pro Leu Pro Ala
 65 70 75 80

20 Ser Ser Tyr Asp Val Phe Phe Ser Asn Ala Gly Val Val Asp Phe Ala
 85 90 95

25 Pro Phe Ala Asp Gln Ser Glu Thr Ala Gln Lys Asp Leu Phe Thr Val
 100 105 110

Asn Leu Leu Ser Pro Val Ala Leu Thr Lys Thr Ile Val Lys Ala Ile
 115 120 125

30 Ala Asp Lys Pro Arg Glu Thr Pro Ala His Ile Ile Phe Thr Ser Ser
 130 135 140

35 Ile Val Gly Ile Arg Gly Val Pro Asn Val Ala Val Tyr Ser Ala Thr
 145 150 155 160

40 Lys Gly Ala Ile Asp Ser Phe Ala Arg Ser Leu Ala Arg Glu Phe Gly
 165 170 175

Pro Lys Asn Ile His Val Asn Cys Val Asn Pro Gly Thr Thr Arg Thr
 180 185 190

45 Glu Met Thr Lys Gly Val Asp Leu Ala Ala Phe Gly Asp Val Pro Ile
 195 200 205

50 Lys Gly Trp Ile Glu Val Asp Ala Ile Ala Asp Ala Val Leu Phe Leu
 210 215 220

55 Ile Lys Ser Lys Asn Ile Thr Gly Gln Ser Leu Val Val Asp Asn Gly
 225 230 235 240

Phe Gly Val

<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									10						15

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

45

50

55

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

Lys Ala Gly Thr Asp Gly Phe Ala Arg Ser Leu Ala Arg Glu Leu Gly
 165 170 175

20 Pro Gln Gly Val His Val Asn Val Val Asn Pro Gly Trp Thr Lys Thr
 180 185 190

25 Asp Met Thr Glu Gly Val Glu Thr Pro Lys Asp Met Pro Ile Lys Gly
 195 200 205

Trp Ile Gln Pro Glu Ala Ile Ala Asp Ala Val Val Phe Leu Ala Arg
 210 215 220

30 Ser Lys Asn Ile Thr Gly Ala Asn Ile Val Val Asp Asn Gly Phe Ser
 225 230 235 240

35 **Thr**

<210> 5

<211> 241

<212> PRT

40 <213> Candida magnoliae

<400> 5

45

50

55

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

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

20 Arg Ser Tyr Asp Val Phe Val Ser Asn Ala Gly Val Ala Ala Phe Ser
 85 90 95

25 Pro Thr Ala Asp His Asp Asp Lys Glu Trp Gln Asn Leu Leu Ala Val
 100 105 110

30 Asn Leu Ser Ser Pro Ile Ala Leu Thr Lys Ala Leu Leu Lys Asp Val
 115 120 125

Ser Glu Arg Pro Val Asp Lys Pro Leu Gln Ile Ile Tyr Ile Ser Ser
 130 135 140

35 Val Ala Gly Leu His Gly Ala Ala Gln Val Ala Val Tyr Ser Ala Ser
 145 150 155 160

40 Lys Ala Gly Leu Asp Gly Phe Met Arg Ser Val Ala Arg Glu Val Gly
 165 170 175

45 Pro Lys Gly Ile His Val Asn Ser Ile Asn Pro Gly Tyr Thr Lys Thr
 180 185 190

Glu Met Thr Ala Gly Ile Glu Ala Leu Pro Asp Leu Pro Ile Lys Gly
 195 200 205

50 Trp Ile Glu Pro Glu Ala Ile Ala Asp Ala Val Leu Phe Leu Ala Lys
 210 215 220

55 Ser Lys Asn Ile Thr Gly Thr Asn Ile Val Val Asp Asn Gly Leu Ile
 225 230 235 240

Ala

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

5

<400> 6

	atggagccac	ctttcattgg	gaagggttgcg	ctggtcacccg	gcccgcgcgc	cggtattgg	60
10	cgtgcattcag	cactggcggt	tgcccgtag	ggtgcccaagg	ttgtcggtgc	tgtatgtgaat	120
	gtcgaggggcg	gggaagagac	gattgcgcgt	tgtcggtgtt	tgaataccga	tgcaatgttc	180
15	gtgcgttgcgt	atgtttcgca	acgcgatgaa	gtggagcgat	taattgctct	ggcagttgac	240
	acgttcggtc	ggatcgactt	tgcgacaaac	aacgcgggaa	ttgaaggcg	gcaggcaatg	300
20	ctggccgatt	atcccgaaga	ggtctggat	cgggtgatcg	agatcaacct	caaaggggtc	360
	tggttgtgt	tgaagtaacg	aatccggcac	atgctcaagc	agggtggcg	tgcgattgt	420
	aataacctcat	cggtcgcccc	tctggccgga	tcacgtggcg	tttcggcgta	tgtagccagc	480
25	aagcacggta	ttgttggtat	taccaaagcg	gcagcccttg	agtatgcgcg	taacggtatt	540
	cgtgtcaacg	caatctgtcc	aggtacgatt	catactgcga	tgtatcgaccc	ctttacccag	600
	ggtgatcccc	aactgcttgc	ccagttcgct	gagggtgaac	cgattggtcg	gctcggtcg	660
30	cctgaagagg	tcgccaatgc	ggtgatctgg	ctctgctcag	ataaggcttc	gtttgtgacc	720
	ggagcgacac	tggcggttga	tggtgccgc	ctggcgtaa			759

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

<400> 7

40

45

50

55

atgctcgagg ggaaggtcgc ggtcatcacg ggggccggaa gcggcatagg ccggggccacc	60
gcgctcaagt tcgcccgcga gggggcccg gtcgtcgccg ccgagctcga cgagcgcggc	120
5 ggggagggggg tggtccggga ggtgcgcagc ctcggggcg aggccgtctt cgtccggacc	180
gacgtctcg ggatcgacg ggtggaggac gccgtcgagc gggcggtcgg ggagtacggc	240
10 accctcgacg tcatgttcaa caacgcggc atcgggact acgccccct gctggagcac	300
gagcccgagc actacgacccg ggtggtccgg gtgaaccagt acggcgtcta ctacggata	360
ctcgccgccc ggagaaagat ggtgcgcctg aagaaccccg gcttcatca caacaccgac	420
15 tcggtctacg ctttcctcgc ctcgcgggg gtcatcggtt accacgcgcgca aaggggcg	480
gtcaagatga tgacccaggc ggcggcgctg gagctcgccc cgacggcat aagggtcg	540
gccatcgccc cggcggggt ggacacccccc atcatccagg gctacaagga catggggctc	600
20 ggcgagaggc tggcccgccg ccagatgcgc cgccggctcc agaccccgaa gcaagatcg	660
ggggcggtcg ccctgctcgc caccgacgag gccgacgcca taaacggctc ggtggatcg	720
accgacgacg gctacgcgga gttcaagtag	750

25 <210> 8

<211> 732

<212> DNA

<213> Canadida magnoliae

30 <400> 8

atgtctgcta cttcgaacgc tcttatcact ggtgccagcc gcggatggg cgagggccaca	60
35 gctattaagc ttgcccttga ggggtacagc gtcacccttg catcacgcgg tattgagcag	120
ctcaatgcca tcaaggaaaa actacccatc gtgaagaagg gccagcagca ctacgttgg	180
cagctcgatc ttagtgacat cgaggcggtt tccaccttca agggggctcc tctgcctgcc	240
40 agcagctacg acgtgttctt cagcaacgccc ggtgtggtgg actttgtctcc gttcgac	300
caaagcgaga ctgcgcaaaa ggacctgttc acggtaacc tgctgtcgcc tgttcggtt	360
45 accaagacca ttgttaaggc catcgccgac aagcccccg agacgcctgc tcacattatc	420
ttcacctcgt ccattgtcgg aattcgccgt gttcccaacg tggcggtcta cagcgccacc	480
50 aaggcgccga ttgacagctt tgcgcgctcg ctgtcgatcg agttcggtcc caagaacatc	540
cacgttaact gcgtgaaccc gggcacgacg cgacccgaga tgacaaagg cggtatctc	600
cgccgtttcg gcgtatgttcc tatcaaggc tggatcgagg tcgtatgcgtat tgccgacgct	660
55 gtgctgttt tgatcaagtc caagaacatc actggccagt cgctcggttg tgacaacgga	720
ttcggtgttt aa	732

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

5

<400> 9

	atgacatcta caccta atgc ctc atc acg ggaggc agcc gcggc attgg cgcttccgcc	60
10	gccatcaa ac tgg ctca aaga agg gtac agc gtc acg ctgg cgtcccg cga cttg agaaa	120
	ctt actg agg tca agg acaa gct gcca atc gtg aga ggtg gac agaa aaca ctac gttt gg	180
15	cag ctcg atc ttg ccg atgt ggagg ctg ca tcgt cttt ca agg cgg ctcc tctg cccg ccc	240
	agc agc t a c g a t t g t t t g t t c g a a c g c c g c g a a t t c t c g c c t a c g g c a g a g	300
	cata cta a a t g t a g t g g c t g a a c a t t a t g a c c a t t a a c t t a g t g t c c c c g a t t g c c c t g	360
20	acg aagg ctc tttt gcagg c cgtt ctgg ggagg ctg a g g t c g a g c g a g a a c c c g t t t c a g a t c g t c	420
	t t c a t c t c g t c g g t c a g c a c t a c g t g g c g t t g c a c a a a c g c c g t c t a c a g t c g t c g	480
	aagg ctgg t a c t g a t g g a t t c g a c g t c a c t t g c t c g g a a c t a g g t c c t a a g g t g t t	540
25	c a t g t g a a c g t g g t a a c c c t g g t g a c t a g a c a t g g a a g g a g g a g t c g a a a c c	600
	c c a a a g g a c a t g c c c a t t a a g g g t g a t c a g c c t g a a t t g c t g a t g t a g t a	660
30	t t c c t t g c g a g g t c g a a a a a c t a c c g g c g c g a a t t t g a t t g g a c a a t g g t t t c t g	720
	a c g t a a	726

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

<400> 10

40	atgacgacta cttcaa acgc gctt gtca ct ggaggc agcc gcggc attgg cgctgc ctcc	60
	g c c a t t a a g c t g g c t c a g g a a g g c t a c a a t g t a c g c t g g c a g t g t g a t a a a	120
45	c t g a a t g a a g t a a a g g c g a a a c t c c c a a t t g t a c a g g a c g g c a g a a g c a c t a c t t g g	180
	g a a c t c g a t c t g g t a g t g t g a c t g c t g g a a g g t g c t c c t t t g c t g c t g	240
	c g c a g c t a c g a c g t t t g t t c g a a c g c g g c g t c g c t g c t c g c c a c a g c c g a c	300
50	c a c g a t g a t a g g a g t g g c a g a a c t t g c t t g c t g a a c t t g c t g c c c a t t g c c c t c	360

	acgaaggccc tcttgaagga tgtctccgaa aggccctgtgg acaagccact gcagattatc	420
	tacatttcgt cggtggccgg cttgcattggc gccgcgcagg tcgcccgtgt aagtgcattct	480
5	aaggccggtc ttgatggttt tatgcgtcc gtcgcccgtg aggtgggccc gaagggcattc	540
	catgtgaact ccatcaaccc cggatacacg aagactgaaa tgaccgcggg cattgaagcc	600
10	cttcctgatt tgcctatcaa ggggtggatc gagcccgagg caattgctga cgcgggtctg	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 cacccttcat tggaaagg	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 aggccggcac catc	34
	<210> 13	
	<211> 38	
45	<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	
	cacatgcattc cagatggagc cacccttcat tggaaagg	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 gccc gagctc ttattaaaca ccgaatccgt tgtc 34

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

55 <213> künstliche Sequenz

<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

15 <220>

 <221> PEPTIDE

 <222> (1) .. (12)

 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

20 <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

30 <220>

 <221> PEPTIDE

 <222> (1)..(12)

 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

35 <400> 20

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

40 40

 <210> 21

 <211> 12

 <212> PRT

 <213> künstliche Sequenz

45 45

 <220>

 <221> PEPTIDE

 <222> (1)..(12)

 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

50 50

 <400> 21

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

55

 <210> 22

 <211> 12

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

5 <220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(12)

<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

10 <400> 22

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
1 5

45 <210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

50 <220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(7)

<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

55 <400> 25

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
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

55 <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

Phe Val Cys Asn Ala Gly
1 5

5 <210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

10 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(6)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz
15 <400> 33

Phe Val Ala Asn Ala Gly
 1 5

20 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

25 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(9)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz
30 <400> 34

Ser Pro Ile Ala Leu Thr Lys Ala Leu
 1 5

35 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

40 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(9)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz
45 <400> 35

Ser Pro Val Ala Leu Thr Lys Thr Ile
 1 5

50 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

55 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(9)
 <223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

5
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(7)
<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

10
<400> 40

10
Ala Val Tyr Ser Ala Thr Lys
1 5

15
<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

20
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(6)
<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

20
<400> 41

25
Pro Ile Lys Gly Trp Ile
1 5

30
<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

35
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(6)
<223> Oxidoreduktase-Partialsequenz

40
<400> 42

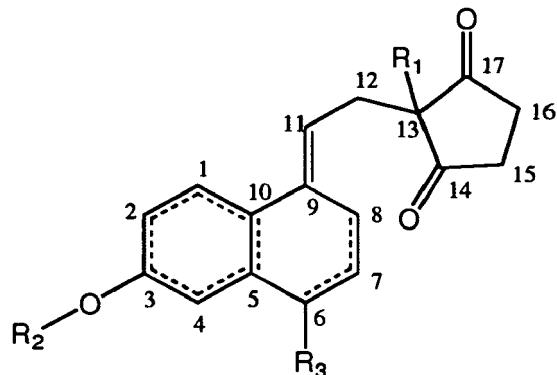
40
Pro Ile Ser Gly Trp Ile
1 5

45 **Patentansprüche**

1. Polypeptid mit Oxidoreduktaseaktivität, welches

- 50 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

(I)



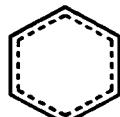
5

10

15

20

worin die Ringstrukturen kein, ein oder mehrere Heteroatome umfassen,
 R₁ Wasserstoff oder eine C₁-C₄-Alkylgruppe ist,
 R₂ Wasserstoff, eine C₁-C₈-Alkylgruppe oder eine OH-Schutzgruppe, wie ein Ester, ist,
 R₃ Wasserstoff, eine Methylgruppe oder ein Halogenid ist,
 das Strukturelement



25

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 Cofaktor reduziert.

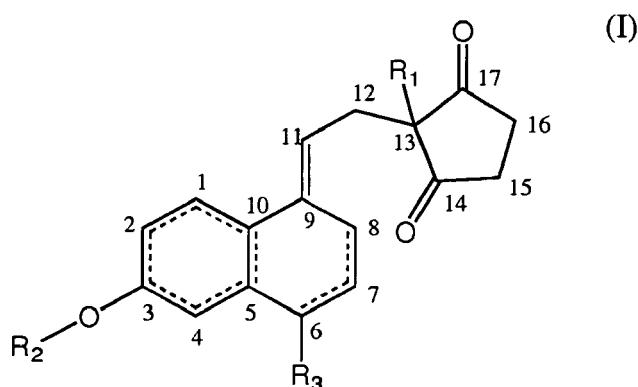
2. Polypeptid mit Oxidoreduktaseaktivität, welches Secodionederivate der allgemeinen Formel I

35

40

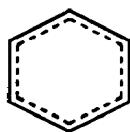
45

55



50

worin die Ringstrukturen kein, ein oder mehrere Heteroatome umfassen,
 R₁ Wasserstoff oder eine C₁-C₄-Alkylgruppe ist,
 R₂ Wasserstoff, eine C₁-C₈-Alkylgruppe oder OH-Schutzgruppe, wie ein Ester, ist,
 R₃ 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,
 15 in Gegenwart von NADH oder NADPH als Cofaktor 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.

15

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

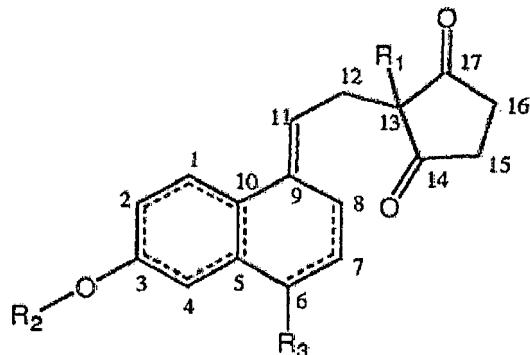
Claims

20

1. Polypeptide having oxidoreductase activity which

25 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

(I)



30

35

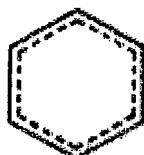
40 where the ring structures comprise no, one or a plurality of heteroatoms,
 R₁ is hydrogen or a C₁-C₄ alkyl group,

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

45

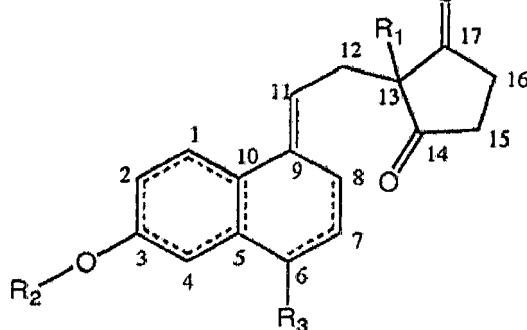


50

55 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

(I)



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

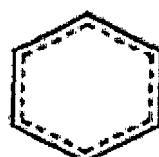
R₁ is hydrogen or a C₁-C₄ alkyl group,

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

R₃ is hydrogen, a methyl group or a halide,

the structural element

20



25

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 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.

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

Revendications

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

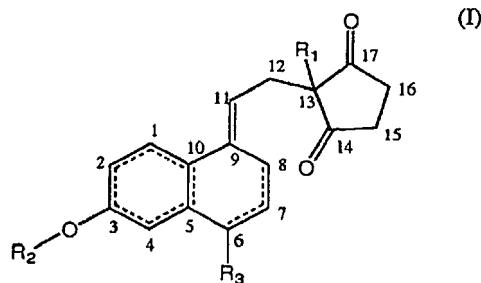
a) présente la séquence d'acides aminés SEQ ID NO :3 ou

b) est codé par la séquence d'acide nucléique SEQ ID NO :8 et réduit des dérivés de sécodione de formule générale I :

45

50

55



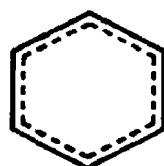
où les structures cycliques ne comprennent pas d'hétéroatomes ou en présentent un ou plusieurs,

5 R₁ est de l'hydrogène ou un groupe alkyle en C₁-C₄,

10 R₂ est de l'hydrogène, un groupement alkyle en C₁-C₈ ou un groupement de protection de OH, tel qu'un ester,

15 R₃ est de l'hydrogène, un groupement méthyle ou un halogénure, l'élément strûcturel :

5



10

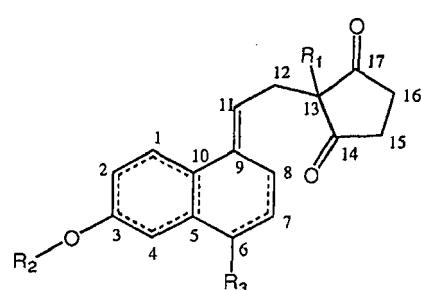
15 représente un cycle de benzène ou un cycle en C₆ avec 0, 1 ou 2 doubles liaisons C-C, une double liaison est contenue éventuellement dans les positions 6/7 ou 7/8 et le carbone est substitué dans les positions 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 et 16 indépendamment par de l'hydrogène, un groupement alkyle en C₁-C₄, 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 :

20

25

(I)



30

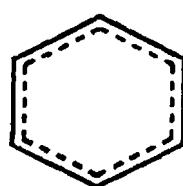
35 où les structures cycliques ne comprennent pas d'hétéroatomes ou en comprennent un ou plusieurs,

R₁ est de l'hydrogène ou un groupement alkyle en C₁-C₄,

R₂ est de l'hydrogène, un groupement alkyle en C₁-C₈ ou un groupement de protection de OH, tel qu'un ester,

R₃ est de l'hydrogène, un groupement méthyle ou un halogénure, l'élément structurel :

35



40

45 représente un cycle de benzène ou un cycle en C₆ 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 C₁-C₄, 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.

50

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

55

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]