

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 380**

51 Int. Cl.:
C12P 33/00 (2006.01)
C12P 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07856445 .7**
- 96 Fecha de presentación: **07.12.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2087127**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.08.2009**

54 Título: **Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona por regeneración de cofactor en continuo**

30 Prioridad:
07.12.2006 AT 20272006

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.08.2012

73 Titular/es:
**IEP GMBH
RHEINGAUSTRASSE 190-196
65203 WIESBADEN, DE**

72 Inventor/es:
**GUPTA, Antje;
TSCHENTSCHER, Anke y
BOBKOVA, Maria**

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 386 380 T3

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

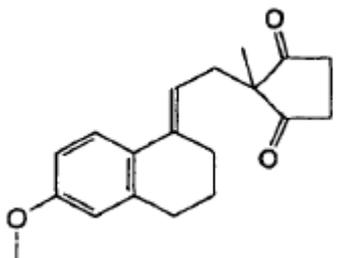
DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona por regeneración de cofactor en continuo

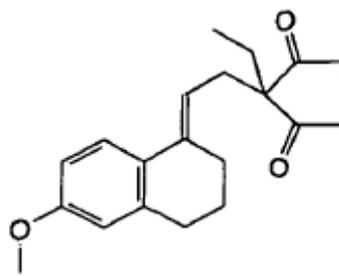
5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona de fórmula general I, en el que el derivado de secodiona se reduce con una oxidorreductasa/deshidrogenasa en presencia de NADH o NADPH como cofactor.

10 La producción industrial de hormonas esteroideas se realiza de dos modos independientes entre sí, a saber, por un lado a partir de compuestos esteroideos de origen natural de fuentes vegetales y por otro lado de forma totalmente sintética mediante síntesis enantioselectiva a partir de precursores proquirales. De estos dos modos, la síntesis total de esteroides se está volviendo cada vez más importante, sobre todo porque esta permite también la introducción de elementos estructurales que no están incluidos en esteroides de origen natural.

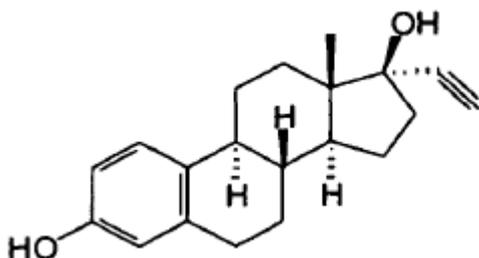
15 Los componentes clave de la síntesis total de esteroides enantioméricamente puros son a este respecto compuestos de fórmula general I que se designan también como secoesteroides, 8,14-seco-gona-tetraen-14,17-dionas o secodionas. Son representantes especiales de este grupo, por ejemplo, los compuestos metilsecodiona (fórmula II, 13-metil-3-metoxi-8,14-seco-gona-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14,17-diona) y etilsecodiona (fórmula III, 13-etil-3-metoxi-8,14-seco-gona-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14,17-diona), a partir de los cuales pueden prepararse, por ejemplo, los compuestos farmacológicamente activos etinilestradiol (fórmula IV) y norgestrel (fórmula V).



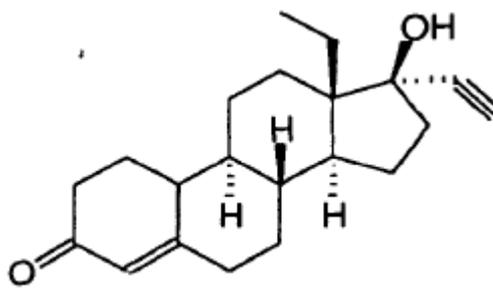
Fórmula II



Fórmula III



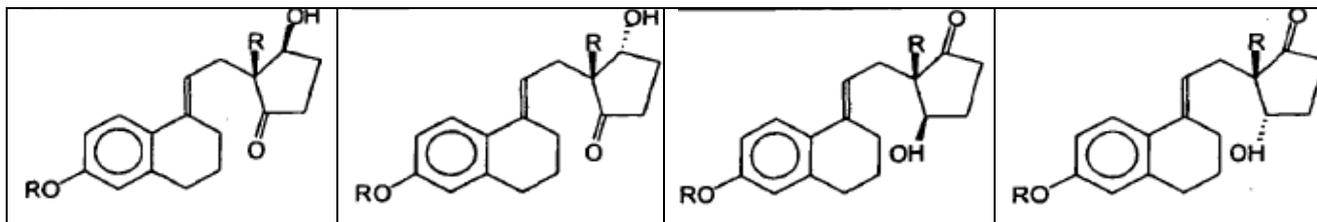
Fórmula IV



Fórmula V

20 La etapa clave en la producción de compuestos esteroideos enantioméricamente puros es a este respecto la transformación del compuesto de fórmula I (por ejemplo, II y III) en un compuesto ópticamente activo con C-13 asimétrico preformado mediante reducción enantioselectiva de uno de los grupos cetona hasta grupos hidroxilo. Los compuestos hidroxisecoesteroides ópticamente activos resultantes (secoles, fórmulas VI a IX) pueden procesarse a continuación mediante ciclación con mantenimiento de la quiralidad hasta compuestos esteroideos quirales.

25 Mediante la reducción enantioselectiva de un grupo cetona del compuesto de fórmula I pueden formarse teóricamente cuatro compuestos ópticamente activos (fórmulas VI a IX).



Fórmula VI (17-beta-OH)	Fórmula VII (17-alfa-OH)	Fórmula VIII (14-beta-OH)	Fórmula IX (14-alfa-OH)
-------------------------	--------------------------	---------------------------	-------------------------

Son de especial interés económico a este respecto los compuestos de fórmula VI en los que el grupo hidroxilo en la posición 17 presenta la configuración beta, ya que estos conducen a derivados de estrona natural. Dichos compuestos se designan también como 17-beta-hidroxisecoesteroides.

- 5 La reducción estereoselectiva de los derivados de secodiona de fórmula general I con la ayuda de distintos microorganismos se estudió con especial intensidad en los años 60 y 70 del siglo XX. A este respecto, pudo mostrarse que distintas cepas de levadura del género *Candida*, *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* y *Hansenula* son capaces de reducir secodionas hasta distintos compuestos hidroxilados (documentos US 3616226, US 1252524, US 3616225).
- 10 Particularmente las levaduras del género *Saccharomyces*, como por ejemplo, *S. uvarum*, pueden utilizarse ventajosamente para producir, por ejemplo, los correspondientes 17-beta-hidroxisecoesteroides (Kosmol *et al.*; Liebigs Ann. Chem. 701, 199 (1967)). Otras cepas de levadura como, por ejemplo *Saccharomyces drosophilum*, reducen la secodiona preferiblemente hasta el correspondiente 14-alfa-hidroxisecoesteroide (Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 22, 463-471 (1975)). Se describe además la formación de 14-alfa-hidroxisecoesteroide mediante la reducción de secodiona por *Bacillus thuringiensis* (Kosmol *et al.*; Liebigs Ann. Chem. 701, 199 (1967)).

Los principios activos gestagénicos y estrogénicos encuentran una amplia aplicación en el mundo como anticonceptivos y en terapia de sustitución hormonal. Hasta ahora, la mayoría de síntesis de derivados estrogénicos y gestagénicos están constituidas por el principio de reacción anteriormente descrito, cuya etapa clave produce la reducción enantioselectiva de secodionas hasta los correspondientes 17-beta-hidroxisecoesteroides.

- 20 La reducción estereoselectiva de los derivados de secodiona se lleva a cabo a este respecto hasta ahora como una biotransformación en célula entera mediante distintas cepas de levadura del género *Pichia* o *Saccharomyces*. Estos procedimientos poseen sin embargo la desventaja de que son practicables solo a muy bajas concentraciones de sustrato bastante por debajo del 1% (generalmente de 1 a 5 g/l) (documento US 3697379; Current Science, 5 de feb. (1984), vol. 53, nº 3, página 124; Indian Journal of Experimental Biology, vol. 27, agosto de 1989, páginas 742-743). Así,
- 25 resulta ser muy costoso particularmente el procesamiento y aislamiento del producto de reacción a partir de grandes volúmenes, así como la separación de grandes cantidades de biomasa.

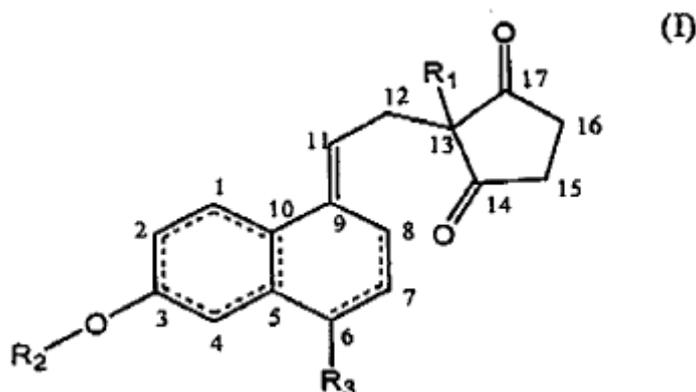
Szentirmai *et al.* (Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae, vol. 22, nº 4, 1975, pág. 463-470) describen un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona, en el que el derivado de secodiona se reduce con una oxidoreductasa/deshidrogenasa en presencia de NADH o NADPH como cofactor. En este

30 procedimiento, se utiliza el derivado de secodiona a una concentración de únicamente 1 g/l en el lote de reacción.

Al entender del inventor, no se han aislado, identificado ni descrito hasta ahora las enzimas participantes en la reducción. Igualmente, no se han identificado todavía secuencias de ADN que codifiquen oxidoreductasas con las que pueda conseguirse la reducción de derivados de secodiona.

- 35 La invención tiene por tanto el objetivo de procurar un procedimiento con el que puedan reducirse enantioselectivamente derivados de secodiona de fórmula general I, particularmente aquellos de fórmula II y III. Entre otros, debe ser posible en este sentido la preparación de los correspondientes 17-beta-hidroxisecoesteroides.

En un primer aspecto, se consigue este objetivo según la invención mediante un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona de fórmula general I,



- 40 en la que

R₁ es hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄,

R₂ es hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₈ o un grupo protector de OH conocido en el estado de la técnica, como un éster,

R₃ es hidrógeno, un grupo metilo o un haluro,

el elemento estructural



5

representa un anillo de benceno o un anillo C₆ con 0, 1 o 2 dobles enlaces C-C, que contiene en las posiciones 6/7 o 7/8 eventualmente un doble enlace y el carbono en las posiciones 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 y 16 está independientemente sustituido con hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄, un haluro o un grupo fenilo,

10

reduciéndose el derivado de secodiona con una oxidorreductasa/deshidrogenasa en presencia de NADH o NADPH como cofactor,

caracterizándose dicho procedimiento porque el derivado de secodiona se utiliza a una concentración ≥ 10 g/l en el lote de reacción y porque el cofactor NAD o NADP oxidado formado por la oxidorreductasa/deshidrogenasa se regenera continuamente.

15

Este procedimiento representa una mejora esencial de la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona frente al estado de la técnica. El procedimiento según la invención posibilita la reducción de derivados de secodiona hasta los distintos hidroxisecoesteroideos correspondientes con enzimas libres en intervalos de concentración que superan con mucho los descritos en el estado de la técnica.

Una forma de realización preferida del procedimiento según la invención se caracteriza porque la oxidorreductasa/deshidrogenasa

20

a) presenta una secuencia de aminoácidos en la que al menos un 50% de los aminoácidos son idénticos a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO: 5,

b) está codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO: 10 o

25

c) está codificada por una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con las SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO: 10.

Se han identificado por los inventores oxidorreductasas que son capaces de reducir derivados de secodiona hasta hidroxisecoesteroideos y que pueden prepararse industrialmente de forma recombinante. Mediante el procedimiento según la invención, pueden conseguirse concentraciones de sustrato esencialmente mayores que en el procedimiento de célula entera usado actualmente.

30

En el procedimiento según la invención, pueden utilizarse las oxidorreductasas de secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5 o un polipéptido derivable de estos polipéptidos totalmente purificado, parcialmente purificado o en forma de células que contienen el polipéptido de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5. Las células utilizadas pueden presentarse a este respecto en forma nativa, permeabilizada o lisada. Preferiblemente, las oxidorreductasas o derivados derivables de las mismas se sobreexpresan en un organismo hospedador adecuado, como por ejemplo *Escherichia coli*, y se utiliza el polipéptido recombinante para la reducción de los derivados de secodiona de fórmula general I.

35

Una secuencia de ADN de SEQ ID NO: 6 que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 1 es obtenible, por ejemplo, a partir del genoma del organismo *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635.

40

Una secuencia de ADN de SEQ ID NO: 7 que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 2 es obtenible, por ejemplo, a partir del genoma del organismo *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941.

Una secuencia de ADN de SEQ ID NO: 8 que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 3 es obtenible a partir de una levadura *Candida magnoliae* CBS 6396.

45

Las oxidorreductasas de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 son obtenibles, por ejemplo, mediante cribado de homología a partir de *Candida magnoliae* DSMZ 70638.

5 Se entiende por una secuencia de ácido nucleico que hibrida, por ejemplo, con la SEQ ID NO: 6 en condiciones rigurosas, un polinucleótido que puede identificarse mediante el procedimiento de hibridación de colonias, el procedimiento de hibridación de placas, el procedimiento de hibridación Southern o similares usando la SEQ ID NO: 6 o secuencias parciales de la SEQ ID NO: 6 como sonda de ADN. Con este fin, se hibrida el polinucleótido inmovilizado sobre un filtro, por ejemplo, con la SEQ ID NO: 6 en una solución de NaCl 0,7-1 M a 60°C. La hibridación se lleva a cabo como se describe, por ejemplo, en "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) o publicaciones similares. A continuación, se lava el filtro con solución de 0,1 a 2 x SSC a 65°C, entendiéndose por solución de 1 x SSC una mezcla compuesta por NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM.

10 Un polinucleótido que hibrida con los polinucleótidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO:8 , SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 de la lista de secuencias en las condiciones rigurosas anteriormente citadas debería presentar al menos un 60% de identidad de secuencia con las secuencias de polinucleótidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, mejor al menos un 80% de identidad, aún mejor un 95% de identidad.

15 Otra forma de realización preferida del procedimiento según la invención se caracteriza porque la oxidorreductasa/deshidrogenasa presenta una longitud de 230 a 260 aminoácidos y comprende una o varias de las secuencias parciales seleccionadas del grupo que consiste en [las secuencias de SEQ ID NO:18 a SEQ ID NO:42]:

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

gysvtla, gynvtla, gysvtlv, gynvtlv,

fkgaplpa, fkaaplpa,

fvsnag, ffsnag, fvcnag, fvanag,

20 spialtkal, spvaltkti, spialtktl, spvamtkal, sqialtkal,

avysask, avysatk,

pikgwi y pisgwi.

25 En el procedimiento según la invención, se utiliza como cofactor NADH o NADPH. Se entiende por el término "NADP" fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina, y por "NADPH" fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido. El término "NAD" significa dinucleótido de nicotinamida y adenina, el término "NADH" dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido".

Según una forma de realización preferida del procedimiento según la invención, se regenera el cofactor oxidado NAD o NADP mediante la oxidación de un alcohol.

30 Se utilizan como cosustrato preferiblemente a este respecto alcoholes primarios y secundarios como etanol, 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol, 2-octanol o ciclohexanol. La proporción de cosustrato para la regeneración puede ascender a 5 a 95% en vol., referido al volumen total.

Preferiblemente, se usa para la regeneración de cofactor un alcohol secundario de fórmula general R_xR_yCHOH , en la que R_x y R_y son independientemente entre sí hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_8 ramificado o no ramificado y $C_{\text{totales}} \geq 3$.

35 Según otra forma de realización preferida del procedimiento según la invención, se añade para la regeneración del cofactor adicionalmente una oxidorreductasa/deshidrogenasa.

40 Las alcohol deshidrogenasas dependientes de NADH adecuadas son obtenibles, por ejemplo, a partir de levadura de panadería, de *Candida parapsilosis* (CPCR) (documentos US 5.523.223 y US 5.763.236, *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, 15(11): 950-8), *Pichia capsulata* (documento DE 10327454.4), de *Rhodococcus erythropolis* (RECR) (documento US 5.523.223), *Nocardia fusca* (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(10), 1999, pág. 1721-1729; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 62(4): 380-6; Epub 26 de abril de 2003) o *Rhodococcus ruber* (*J. Org. Chem.*, 2003, 68(2): 402-6). Los cosustratos adecuados para estas alcohol deshidrogenasas son, por ejemplo, los alcoholes secundarios ya citados como 2-propanol (isopropanol), 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-octanol o ciclohexanol.

45 Son alcohol secundario deshidrogenasas adecuadas para la regeneración del NADPH, por ejemplo, aquellas que se describen y aíslan a partir de organismos del orden lactobacilar, por ejemplo, *Lactobacillus kefir* (documento US 5.200.335), *Lactobacillus brevis* (DE 19610984 A1; *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* diciembre de 2000; 56 Pt 12: 1696-8), *Lactobacillus minor* (documento DE 10119274), *Leuconostoc carnosum* (A 1261/2005, Kl. C12N) o aquellas como se describen a partir de *Thermoanaerobium brockii*, *Thermoanaerobium ethanolicus* o *Clostridium beijerinckii*.

50 Para la regeneración del cofactor, pueden usarse en principio también otros sistemas enzimáticos. Por ejemplo, puede llevarse a cabo la regeneración del cofactor mediante formiato deshidrogenasas dependientes de NAD o NADP (Tishkov *et al.*, *J. Biotechnol. Bioeng.* [1999] 64, 187-193, "Pilot-scale production and isolation of recombinant NAD and NADP specific formate dehydrogenase"). Son cosustratos adecuados de la formiato deshidrogenasa, por ejemplo, sales de ácido fórmico como formiato de amonio, formiato de sodio o formiato de calcio.

El TTN (número de recambio total = mol de compuesto de secodiona reducida/mol de cofactor utilizado) alcanzado en el procedimiento según la invención se encuentra generalmente en el intervalo de 10^2 a 10^5 , preferiblemente asciende sin embargo a $\geq 10^3$.

5 Según una forma de realización preferida, se lleva a cabo el procedimiento según la invención en un sistema bifásico acuoso-orgánico.

10 Por consiguiente, la reacción del derivado de secodiona se realiza en un sistema bifásico que contiene, por ejemplo, un 2-alcohol para la regeneración del cofactor, una oxidoreductasa, agua, cofactor y el compuesto de secodiona. Pueden incluirse sin embargo también disolventes orgánicos adicionales que no participan en la regeneración del cofactor, es decir, que no contienen grupos hidroxilo oxidables. Preferiblemente, se utilizan como disolventes orgánicos adicionales dietiléter, *terc*-butilmetiléter, diisopropiléter, dibutiléter, acetato de etilo, acetato de butilo, heptano, hexano, tolueno, diclorometano, ciclohexano o mezclas de los mismos.

La proporción de componentes orgánicos inmiscibles con agua del sistema bifásico puede ascender a este respecto de 10% a 90%, preferiblemente de 20% a 80%, referido al volumen total del lote de reacción. La proporción acuosa puede ascender a 90% a 10%, preferiblemente de 80% a 20%, referida al volumen total del lote de reacción.

15 Puede añadirse también un tampón al agua, por ejemplo, tampón fosfato de potasio, Tris/HCl, glicina o trietanolamina con un valor de pH de 5 a 10, preferiblemente de 6 a 9. El tampón puede contener adicionalmente iones para la estabilización o activación de ambas enzimas, por ejemplo iones de magnesio o iones de cinc.

Además, pueden utilizarse en los procedimientos según la invención otros aditivos para la estabilización de la enzima usada, por ejemplo, glicerina, sorbitol, 1,4-D,L-ditiotreitol (DTT) o dimetilsulfóxido (DMSO).

20 La concentración del cofactor NAD(P)H, referida a la fase acuosa, asciende de 0,001 mM a 10 mM, particularmente de 0,01 mM a 1,0 mM. La temperatura puede ascender, dependiendo de las propiedades especiales de las enzimas utilizadas, a 10°C a 70°C, preferiblemente a 20°C a 35°C.

25 Los derivados de secodiona a reducir son generalmente poco hidrosolubles. El sustrato puede presentarse por tanto durante la reacción completa o también incompletamente disuelto. Si el sustrato no se disuelve completamente en la mezcla de reacción, una parte del sustrato se presenta en forma sólida y puede formar así una tercera fase sólida. La mezcla de reacción puede formar durante la reacción también temporalmente una emulsión.

El derivado de secodiona de fórmula general I se utiliza en el procedimiento según la invención preferiblemente en una cantidad de 10 g/l a 500 g/l, preferiblemente de 25 g/l a 300 g/l, con especial preferencia de 50 g/l a 200 g/l, referida del volumen total en el lote de reacción.

30 Las formas de realización preferidas de la invención se caracterizan además porque se utiliza como derivado de secodiona 13-etil-3-metoxi-8,14-seco-gona-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14,17-diona (etilsecodiona – fórmula III) o 13-metil-3-metoxi-8,14-seco-gona-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14,17-diona (metilsecodiona- fórmula II).

35 Los procedimientos según la invención se llevan a cabo, por ejemplo, en un recipiente de reacción de vidrio o metal. Para ello, se incorporan los componentes individualmente al recipiente de reacción y se agitan bajo atmósfera, por ejemplo, de nitrógeno o aire. Según el compuesto de secodiona utilizado y la oxidoreductasa, el tiempo de reacción asciende a una hora hasta 7 días, particularmente a 2 horas hasta 48 horas. En este tiempo, se reduce el compuesto de secodiona al menos un 50% hasta el correspondiente compuesto hidroxiseoesteroideo.

La presente invención se ilustra a continuación mediante los ejemplos.

Ejemplo 1 no según la invención

40 Clonación de una oxidoreductasa de *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635

A) Cultivo de *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635

45 Se cultivaron células de *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635 en el siguiente medio (pH 8,2) a 48°C en un incubador bacteriano a la luz: 0,1% de extracto de levadura, 0,1% de glicilglicina, 0,01% de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,01% de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,01% de KNO_3 , 0,05% de NaNO_3 , 0,01% de NaCl , 0,005% de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 5 ml de una solución de citrato de hierro (III), 1 ml de solución de oligoelementos SL-6 [H_2SO_4 500 $\mu\text{l/l}$, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 2,28 g/l, $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 500 mg/l, 500 mg de H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 25 mg/l, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 25 mg/l, $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 45 mg/l]. El día 12 del cultivo, se separaron las células mediante centrifugación del medio de cultivo y se almacenaron a -80°C.

B) Amplificación del gen que codifica la oxidoreductasa selectiva

50 Se extrajo ADN genómico según el procedimiento descrito en "Molecular Cloning" de Manniatis y Sambrook. El ácido nucleico resultante sirvió como matriz para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos, que se derivaron de la secuencia génica publicada con el número 76258197 en el banco de datos NCBI. A este

respecto, se proporcionaron los cebadores para una posterior clonación en un vector de expresión 5' terminal con sitios de corte de restricción para las endonucleasas Nde I e Hind III o Sph I (SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13).

Se llevó a cabo la amplificación en un tampón de PCR [Tris-HCl 10 mM, (pH 8,0); KCl 50 mM; MgSO₄ 10 mM; mezcla de dNTP 1 mM; 20 pmol de cada cebador y 2,5 U de ADN polimerasa Pfx Platinum (Invitrogen)] con 500 ng de ADN genómico y los siguientes ciclos de temperaturas:

- 5 ciclo 1: 94°C, 2 min
- ciclo 2 x 30: 94°C, 30 s
56°C, 30 s
68°C, 60 s
- 10 ciclo 3: 68°C, 7 min
4°C, ∞

Se digirió el producto de PCR resultante de un tamaño de aproximadamente 750 pb después de la purificación sobre un gel de agarosa al 1% con ayuda de las endonucleasas de restricción Nde I e Hind III, o con las endonucleasas Sph I e Hind III y se ligó con el esqueleto tratado con las mismas endonucleasas de los vectores pET21a (Novagen) o pQE70 (Qiagen). Después de la transformación de 2 µl de la preparación de ligamiento en células Top 10 F' de *E. coli* (Invitrogen), se ensayó en ADN de plásmido de colonias resistentes a ampicilina (o kanamicina), mediante un análisis de restricción con las endonucleasas Nde I e Hind III o las endonucleasas Sph I e Hind III, la presencia de un inserto de 750 pb de tamaño. Se sometieron las preparaciones de plásmido de los clones positivos de fragmento a un análisis de secuencia y a continuación se transformaron en *Escherichia coli* BL21 Star (Invitrogen) o *E. coli* RB791 (reserva genética, Yale).

Ejemplo 2 no según la invención

Expresión de oxidorreductasa de *Chloroflexus* recombinante en *E. coli*

Se cultivaron las cepas de *Escherichia coli* transformadas con el constructo de expresión BL21 Star (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) o RB791 (reserva genética de *E. coli*, Yale, EE.UU.) en 200 ml de medio LB (1% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, 1% de NaCl) con ampicilina (50 µg/ml) o carbenicilina (50 µg/ml), hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,5, medida a 550 nm. Se indujo la expresión de proteína recombinante mediante la adición de tiogalactósido de isopropilo (IPTG) a una concentración de 0,1 mM. Después de 8 horas o 16 horas de inducción a 25°C y 220 rpm, se recogieron las células y se congelaron a -20°C. Para el ensayo de actividad, se mezclaron 10 mg de células con 500 µl de tampón TEA 100 mM pH 7,0 y 500 µl de perlas de vidrio y se disgregaron durante 10 minutos mediante un molino de bolas. Se diluyó entonces el lisado obtenido para utilizar en las correspondientes medidas. El ensayo de actividad estaba compuesto como sigue: 870 µl de tampón TEA 100 mM pH 7,0, 160 µg de NADH, 10 µl de lisado celular diluido. Se inició la reacción mediante la adición de 100 µl de una solución de sustrato 100 mM a la mezcla de reacción.

Para la obtención de enzima en grandes cantidades, se resuspendieron 30 g de células en 150 ml de tampón trietanolamina (100 mM, pH 7, MgCl₂ 2 mM, 10% de glicerina) y se disgregaron mediante un homogeneizador de alta presión. Se mezcló a continuación la solución enzimática con 150 ml de glicerina y se almacenó a -20°C.

Ejemplo 3 no según la invención

Cultivo de organismos y cribado de reacción reductiva de etilsecodiona (fórmula III)

Para el cribado, se cultivaron las cepas de levadura *Pichia farinosa* DSM 70362, *Candida gropengiesseri* MUCL 29836, *Candida vaccinii* CBS 7318, *Pichia farinosa* DSM 3316, *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1508 y *Candida magnoliae* CBS 6396 en el siguiente medio: extracto de levadura (5), peptona (5) y glucosa (20) (los números entre paréntesis son respectivamente g/l). Se esterilizó el medio a 121°C y cultivaron las levaduras sin más regulación del pH a 25°C con un agitador a 140 rpm.

Se ensayó la reacción reductiva de etilsecodiona de fórmula III hasta el correspondiente compuesto hidroxisecoesteroideo en las siguientes preparaciones de biotransformación de célula entera:

Se agitaron 400 mg de células recién recogidas en un lote con 50 mg de glucosa, 10 mg de etilsecodiona de fórmula III y 900 µl de tampón trietanolamina (TEA) 100 mM pH 7,0 durante 24 horas a 28°C y a 1400 rpm. A continuación, se extrajeron los lotes con 1 ml de diclorometano, se centrifugaron, se secaron con nitrógeno y se suspendieron en acetonitrilo para dar el análisis de HPLC.

50 Los resultados del cribado se resumen en la tabla 1.

Tabla 1

Nº de cepa	Microorganismo	Reacción de etilsecodiona después de 24 h con cepas Wt
		Lote 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%

La cepa CBS 6396 mostraba la mayor reacción de etilsecodiona y se seleccionó por tanto como organismo de partida para la preparación de una biblioteca de ADNc.

5 Ejemplo 4 no según la invención

Preparación de una biblioteca de ADNc a partir de *Candida magnoliae* CBS 6396 y la clonación de oxidoreductasa

A) Aislamiento (de ARN total y ARNm) así como preparación de la biblioteca de ADNc

Se resuspendieron 600 mg de células recientes en 2,5 ml de tampón LETS enfriado con hielo. Se añadieron a esta suspensión celular 5 ml (aproximadamente 20 g) de perlas de vidrio lavadas con ácido nítrico y se equilibró con 3 ml de fenol (pH 7,0). Se trató el lote total entonces respectivamente con 30 s de vórtex y 30 s de enfriamiento sobre hielo alternativamente para un total de 10 min. A continuación, se añadieron 5 ml de tampón LETS enfriado con hielo y se mezcló de nuevo fuertemente con vórtex. Se centrifugó esta suspensión celular durante 5 min a 11000 g a 4°C. Se obtuvo la fase acuosa y se extrajo dos veces con el mismo volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1). A continuación, siguió la extracción con cloroformo. Después de la última extracción, se precipitó el ARN total mediante la adición de 1/10 vol. de LiCl₂ 5 M a -20°C durante 4 h.

Se empleó 1 mg del ARN total así obtenido sobre oligo-dT celulosa (NEB Biolabs) para el enriquecimiento de las moléculas de ARNm. Después de la precipitación posterior, se usaron 5 µg de ARNm para la síntesis de ADNc (kit de construcción de la biblioteca de ADNc de pBluescript IIXR, Stratagene). La biblioteca construida según las instrucciones del fabricante se transformó en *E. coli* XL-10 y se cribó la actividad de una ADH. Por la reducción de la extinción con NADPH o NADH como cofactor y etilsecodiona (fórmula III) como sustrato, se identificó y aisló un clon (cM4). La secuenciación del plásmido aislado del clon con el cebador T7 y el cebador T3 dio como resultado un ORF de 789 pb. Este fragmento codificaba una proteína de fusión de un tamaño de 262 aminoácidos y estaba compuesto por el fragmento a de la β-galactosidasa y la secuencia de una presunta alcohol deshidrogenasa de cadena corta.

B) Síntesis de una ADH de cadena corta a partir de *Candida magnoliae* CBS 6396 que codifica transcritos completos mediante PCR

Se construyeron cebadores específicos para una posterior clonación del transcrito completo en el sistema de expresión oportuno. A este respecto, se modificó el cebador 5' con una secuencia de reconocimiento de Nde I o Sph I y el cebador 3' con una secuencia de reconocimiento de Xho I o Sac I (SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17). El ADN de plásmido, aislado a partir del clon (cM4) de la biblioteca de expresión de *Candida magnoliae*, sirvió como matriz para la reacción en cadena de la polimerasa. La amplificación se llevó a cabo en un tampón de PCR [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0); KCl 50 mM; MgSO₄ 10 mM; mezcla de dNTP 1 mM; 20 pmol de cada cebador y 2,5 U de ADN polimerasa Pfx Platinum (Invitrogen)] con 50 ng de matriz y los siguientes ciclos de temperatura:

ciclo 1 : 94°C, 2 min

ciclo 2 x 30: 94°C, 15 s

35 58°C, 30 s

68°C, 75 s

ciclo 3: 68°C, 7 min

4°C, ∞

40 Se digirió el producto de PCR resultante después de purificación sobre gel de agarosa al 1% con ayuda de las endonucleasas de restricción Nde I y Xho I o las endonucleasas Sph I y Sac I y se ligó el esqueleto tratado con las mismas endonucleasas de los vectores pET21a (Novagen) o pQME70. Después de la transformación de 2 µl de la

5 preparación de ligamiento en células Top 10 F' de *E. coli* (Invitrogen), se ensayó en ADN de plásmido de colonias resistentes a ampicilina (o kanamicina) mediante un análisis de restricción con las endonucleasas Nde I y Xho I o las endonucleasas Sph I y SacI la presencia de un inserto de 750 pb de tamaño. Se secuenciaron los constructos de expresión de pET21-MgIV y pQME70-MgIV. El gen que codifica una oxidorreductasa de cadena corta de *Candida magnoliae* poseía un marco de lectura abierto de en total 729 pb (contenido en la SEQ ID NO:8) que correspondía a una proteína de 243 aminoácidos (SEQ ID NO:3)

Ejemplo 5 no según la invención

Expresión de oxidorreductasa recombinante en células de *E. coli*

10 Se transformaron con los constructos de expresión que codifican oxidorreductasas pET21-MgIV o pQME70-MgIV células de *Escherichia coli* competentes StarBL21(De3) (Invitrogen) o RB791 (reserva genética de *E. coli*, Yale, EE.UU.). Se cultivaron entonces las colonias de *Escherichia coli* transformadas con los constructos de expresión en 200 ml de medio LB (1% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, 1% de NaCl) con ampicilina 50 µg/ml o kanamicina 40 µg/ml, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5, medida a 550 nm. Se indujo la expresión de proteína recombinante mediante la adición de tiogalactósido de isopropilo (IPTG) a una concentración de 0,1 mM. Después de 16 horas de inducción a 15 25°C y 220 rpm, se recogieron las células y se congelaron a -20°C. Para el ensayo de actividad, se mezclaron 10 mg de células con 500 µl de tampón TEA 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 1 mM y 500 µl de perlas de vidrio y se disgregaron durante 10 min mediante un molino de bolas. Se diluyó entonces el lisado para utilizar en las correspondientes medidas.

20 El ensayo de actividad estaba compuesto como sigue: 960 µl de tampón TEA 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 1bmM, 160 µg de NADPH, 10 µl de lisado celular diluido. Se inició la reacción mediante la adición de 10 µl de una solución de sustrato 100 mM en 70% de metanol a la mezcla de reacción.

Para la obtención de enzima en grandes cantidades, se resuspendieron 30 g de células en 150 ml de tampón trietanolamina (100 mM, pH 7, MgCl₂ 2 mM, 10% de glicerina) y se disgregaron mediante homogeneizador de alta presión. Se mezcló a continuación la solución enzimática con 150 ml de glicerina y se almacenó a -20°C.

Ejemplo 6

Reducción de etilsecodiona (fórmula III) mediante la oxidorreductasa de SEQ ID NO:1

25 Para la reducción de etilsecodiona (fórmula III), se incubó en un recipiente de reacción una mezcla de 800 µl de tampón (fosfato de potasio 100 mM, pH = 7, MgCl₂ 2 mM), 1,2 ml de 2-propanol, 0,08 mg de NAD, 100 mg de etilsecodiona (fórmula III) y 1 ml de suspensión enzimática de oxidorreductasa de SEQ ID NO:1 (véase el ejemplo 3) durante 24 h a temperatura ambiente con agitación constante. Después de 96 h, se redujo >90% de la etilsecodiona utilizada (fórmula III).

Después de terminada la reacción, se procesó la mezcla de reacción mediante extracción con diclorometano, se separó la fase orgánica que contenía el producto y se obtuvo el compuesto de 17-beta-hidroxilo (etilsecol) mediante evaporación/destilación del disolvente.

35 La reacción de la etilsecodiona hasta etilsecol se siguió mediante HPLC. Para ello, se usó una columna de separación EC 125/4 Nucleodur 100-5 C18ec (Machery-Nagel, Düren, Alemania) con acetonitrilo y agua como fase móvil. Para la analítica, se empleó un gradiente lineal de la proporción de acetonitrilo en la fase móvil de 30 a 70%. La identificación de los productos de reacción se realizó mediante comparación con sustancias de referencia.

Ejemplo 7

Reducción de etilsecodiona (fórmula III) mediante la oxidorreductasa de SEQ ID NO:2

40 Para la reducción de etilsecodiona (fórmula III), se incubó en un recipiente de reacción una mezcla de 250 µl de tampón (trietanolamina 100 mM, pH = 8, MgCl₂ 2 mM), 250 µl de 4-metil-2-pentanol, 0,02 mg de NAD, 25 mg de etilsecodiona (fórmula III) y 25 µl de suspensión enzimática de la oxidorreductasa de SEQ ID NO:2 (véase el ejemplo 3) durante 96 h a temperatura ambiente con agitación continua. Después de 96 h, se redujo >30% de la etilsecodiona utilizada (fórmula III) hasta el compuesto hidroxilado.

45 Después de terminada la reacción, se procesó la mezcla de reacción mediante extracción con diclorometano, se separó la fase orgánica que contenía el producto y se obtuvo el compuesto de 17-beta-hidroxilo (etilsecol) mediante evaporación/destilación del disolvente.

Ejemplo 8

Reducción de etilsecodiona (fórmula III) mediante la oxidorreductasa de SEQ ID NO:3

50 Para la reducción de etilsecodiona (fórmula III), se incubó en un recipiente de reacción una mezcla de 100 µl de tampón (trietanolamina 100 mM, pH = 7, MgCl₂ 2 mM), 400 µl de 4-metil-2-pentanol, 0,02 mg de NADP, 25 mg de etilsecodiona (fórmula III) y 100 µl de suspensión enzimática de la oxidorreductasa de SEQ ID NO:3 (véase el ejemplo 3) durante 72 h

a temperatura ambiente con agitación constante. Después de 72 h, se redujo >95% de la etilsecodiona utilizada (fórmula III) hasta el compuesto hidroxilado.

Ejemplo 9

Reducción de etilsecodiona (fórmula III) mediante la oxidorreductasa de SEQ ID NO:4

5 Para la reducción de etilsecodiona (fórmula III), se incubó en un recipiente de reacción una mezcla de 200 µl de tampón (trietanolamina 100 mM, pH = 9, MgCl₂ 2 mM), 300 µl de 2-heptanol, 0,025 mg de NADP, 100 mg de etilsecodiona (fórmula III) y 50 µl de suspensión enzimática de la oxidorreductasa de SEQ ID NO:4 (véase el ejemplo 3) durante 72 h a temperatura ambiente con agitación constante. Después de 72 h, se redujo >80% de la etilsecodiona utilizada (fórmula III) hasta el compuesto hidroxilado.

10 **Ejemplo 10**

Reducción de etilsecodiona (fórmula III) mediante la oxidorreductasa de SEQ ID NO:5

15 Para la reducción de etilsecodiona (fórmula III), se incubó en un recipiente de reacción una mezcla de 300 µl de tampón (trietanolamina 100 mM, pH = 7, MgCl₂ 2 mM), 1,2 ml de 4-metil-2-pentanol, 0,12 mg de NADP, 150 mg de etilsecodiona (fórmula III) y 0,6 ml de suspensión enzimática de la oxidorreductasa de SEQ ID NO:5 (véase el ejemplo 3) durante 72 h a temperatura ambiente con agitación constante. Después de 72 h, se redujo >90% de la etilsecodiona utilizada (fórmula III) hasta el compuesto hidroxilado.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> IEP GmbH
- <120> Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona
- <130> I 11005
- 5 <160> 42
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 252
- <212> PRT
- 10 <213> *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635
- <400> 1

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

ES 2 386 380 T3

<210> 2

<211> 249

<212> PRT

<213> *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941

5 <400> 2

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

ES 2 386 380 T3

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

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

Leu Ala Ser Arg Gly Ile Glu Gln Leu Asn Ala Ile Lys Glu Lys Leu
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Val

ES 2 386 380 T3

<210> 4

<211> 241

<212> PRT

<213> *Candida magnoliae* DSM 70638

5 <400> 4

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

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

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

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

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

Pro Thr Ala Glu His Thr Asn Ser Glu Trp Leu Asn Ile Met Thr Ile
100 105 110

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

Ser Gly Arg Ser Ser Glu Asn Pro Phe Gln Ile Val Phe Ile Ser Ser
130 135 140

Val Ala Ala Leu Arg Gly Val Ala Gln Thr Ala Val Tyr Ser Ala Ser
145 150 155 160

ES 2 386 380 T3

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

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

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

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

Thr

<210> 5

<211> 241

5 <212> PRT

<213> *Candida magnoliae* DSM 70638

<400> 5

ES 2 386 380 T3

Met Thr Thr Thr Ser Asn Ala Leu Val Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Gly Ala Ala Ser Ala Ile Lys Leu Ala Gln Glu Gly Tyr Asn Val Thr
 20 25 30
 Leu Ala Ser Arg Ser Val Asp Lys Leu Asn Glu Val Lys Ala Lys Leu
 35 40 45
 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
 Arg Ser Tyr Asp Val Phe Val Ser Asn Ala Gly Val Ala Ala Phe Ser
 85 90 95
 Pro Thr Ala Asp His Asp Asp Lys Glu Trp Gln Asn Leu Leu Ala Val
 100 105 110
 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
 Val Ala Gly Leu His Gly Ala Ala Gln Val Ala Val Tyr Ser Ala Ser
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Leu Asp Gly Phe Met Arg Ser Val Ala Arg Glu Val Gly
 165 170 175
 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
 Trp Ile Glu Pro Glu Ala Ile Ala Asp Ala Val Leu Phe Leu Ala Lys
 210 215 220
 Ser Lys Asn Ile Thr Gly Thr Asn Ile Val Val Asp Asn Gly Leu Ile
 225 230 235 240
 Ala

ES 2 386 380 T3

<210> 6

<211> 759

<212> ADN

<213> *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635

5 <400> 6

```

atggagccac ctttcattgg gaagggttgcg ctggtcaccg gcgcagcagc cggtattggt      60
cgtgcttcag cactggcggtt tgcccgtgag ggtgcccaagg ttgtcgttgc tgatgtgaat      120
gtcgagggcg ggggaagagac gattgctgctg tgctcgggctt tgaataccga tgcaatgttc      180
gtgctgttgg atgtttcgcg acgctgatgaa gtggagcgcg taattgctct ggcagttgac      240
acgttcggtc ggatcgactt tgcgcacaac aacgccggga ttgaaggcgt gcaggcaatg      300
ctggccgatt atcccgaaga ggtctgggat cgggtgatcg agatcaacct caaaggggtc      360
tggttgtgta tgaagtacga aatccggcac atgctcaagc aggggtggcgg tgcgattgtg      420
aatacctcat cggctcgccgg tctggccgga tcacgtggcg tttcggcgta tgtagccagc      480
aagcacggta ttgttggtat taccaaagcg gcagcccttg agtatgcgcg taacgggtatt      540
cgtgtcaacg caatctgtcc aggtacgatt catactgcga tgatcgaccg ctttaccag      600
ggtgatcccc aactgcttgc ccagttcgtc gaggggtgaac cgattggctc gctcggctcg      660
cctgaagagg tcgccaatgc ggtgatctgg ctctgctcag ataaggcttc gtttgtgacc      720
ggagcgacac tggcggttga tgggtggccgc ctggcgtaa      759

```

<210> 7

<211> 750

10 <212> ADN

<213> *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941

<400> 7

```

atgctcgagg ggaaggctgc ggtcatcacg ggggccggaa gcggcatagg ccgggccacc      60

```

ES 2 386 380 T3

gcgctcaagt tcgcccgcga gggggcccgg gtcgtcgccg ccgagctcga cgagcgcggc 120
 ggggaggggg tgggccggga ggtgctcagc ctcggggggc aggcgggtctt cgtccggacc 180
 gacgtctcgg agttcgcgca ggtggaggac gccgtcgagc gggcggtcgg ggagtacggc 240
 accctcgacg tgatgttcaa caacgccggc atcgggcaact acgccccctt gctggagcac 300
 gagcccgagc actacgaccg ggtggtccgg gtgaaccagt acggcgtcta ctacgggata 360
 ctcgccgccg ggagaaagat ggtcgccctg aagaacccccg gcttgatcat caacaccgcc 420
 tcggtctacg ccttcctcgc ctcgccgggg gtcacggct accacgccgc caagggggcg 480
 gtcaagatga tgaccagggc ggcggcgctg gagctcgccc cgcacggcat aagggtcgtc 540
 gccatcgccc cgggcgggggt ggacaccccc atcatccagg gctacaagga catggggctc 600
 ggcgagaggc tggcccgcgg ccagatgcgc cgccggctcc agacccccga gcagatcgcc 660
 ggggcggtcg ccctgctcgc caccgacgag gccgacgcca taaacggctc ggtggtcatg 720
 accgacgacg gctacgcgga gttcaagtag 750

<210> 8

<211> 732

5 <212> ADN

<213> *Candida magnoliae* CBS 6396

<400> 8

atgtctgcta cttcgaacgc tcttatcact ggtgccagcc gcggaatggg cgaggccaca 60
 gctattaagc ttgcccttga ggggtacagc gtcacccttg catcacgcgg tattgagcag 120
 ctcaatgcc acaaggaaaa actaccatc gtgaagaagg gccagcagca ctacgtttgg 180
 cagctcgatc ttagtgacat cgaggcggct tccaccttca agggggctcc tctgcctgcc 240
 agcagctacg acgtgttctt cagcaacgcc ggtgtggtgg actttgctcc gttcgcagac 300
 caaagcgaga ctgcgcaaaa ggacctgttc acggttaacc tgctgtcgcc tgttgcggtg 360
 accaagacca ttgttaaggc catcgccgac aagccccgcg agacgcctgc tcacattatc 420
 ttcacctcgt ccattgtcgg aattcgcggg gttcccaacg tggcggctta cagcgcacc 480
 aagggcgcga ttgacagctt tgcgcgctcg cttgctcgtg agttcggctc caagaacatc 540
 cacgttaact gcgtgaacct gggcacgacg cgcaccgaga tgacaaaagg cgttgatctc 600
 gcggcctttc gcgatgttcc tatcaagggc tggatcgagg tcgatgcat tgccgacgct 660
 gtgctgtttt tgatcaagtc caagaacatc actggccagt cgctcgttgt tgacaacgga 720
 ttcggtgttt aa 732

10 <210> 9

<211> 726

ES 2 386 380 T3

<212> ADN

<213> *Candida magnoliae* DSM 70638

<400> 9

```

atgacatcta cacctaatgc cctcatcacg ggaggcagcc gcggcattgg cgcttccgcc      60
gccatcaaac tggctcaaga aggggtacagc gtcacgctgg cgtcccgcga ccttgagaaa      120
cttactgagg tcaaggacaa gctgccaatc gtgagaggtg gacagaaaca ctacgtttgg      180
cagctcgatc ttgccgatgt ggaggctgca tcgtctttca aggcggctcc tctgceggcc      240
agcagctacg atttgtttgt ttcgaacgcc ggaattgccc agttctcgcc tacggcagag      300
catactaata gtgagtggct gaacattatg accattaact tagtgcccc gattgccttg      360
acgaaggctc ttttgcaggc cgtttctggg aggtcgagcg agaaccggtt tcagatcgtc      420
ttcatctcgt cggttgcagc actacgtggc gttgcacaaa cggccgtcta cagtgcgctg      480
aaggctggta ctgatggatt cgcacgctca cttgctcgcg aactagggtcc tcaaggtggt      540
catgtgaacg tgggtgaacc tggctggact aagacagaca tgacggaagg agtcgaaacc      600
ccaaaggaca tgcccattaa gggctggatc cagcctgagg caattgctga tgctgtagta      660
ttccttgcca ggtcgaaaaa cattaccggc gcgaatattg tagtggacaa tggtttctcg      720
5  acgtaa      726

```

<210> 10

<211> 726

<212> ADN

10 <213> *Candida magnoliae* DSM 70638

<400> 10

ES 2 386 380 T3

atgacgacta cttcaaacgc gcttgtcact ggaggcagcc gcggcattgg cgctgcctcc 60
gccattaagc tggctcagga gggctacaat gttacgctgg cctctcgag tgttgataaa 120
ctgaatgaag taaaggcgaa actcccaatt gtacaggacg ggcagaagca ctacatttgg 180
gaactcgatc tggctgatgt ggaagctgct tcgtcgttca aggggtgctcc tttgcctgct 240
cgcagctacg acgtctttgt ttcgaacgcg ggcgctgctg cgttctcgcc cacagccgac 300
cacgatgata aggagtggca gaacttgctt gccgtgaact tgctgctgcc cattgccctc 360
acgaaggccc tcttgaagga tgtctccgaa aggctgtgg acaagccact gcagattatc 420
tacatttcgt cgggtggccgg cttgcatggc gccgcgcagg tcgccgtgta cagtgcattc 480
aaggccggtc ttgatggttt tatgcgctcc gtcgcccgtg aggtgggccc gaagggcatc 540
catgtgaact ccatcaacc cggatacacg aagactgaaa tgaccgcggg cattgaagcc 600
cttctgatt tgcctatcaa ggggtggatc gagcccgagg caattgctga cgcggttctg 660
tttctggcaa agtccaagaa taccaccggc acaaacattg tggtcgacaa tggcttgatt 720
gcttaa 726

<210> 11

<211> 38

5 <212> ADN

<213> Constructo sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(38)

10 <400> 11

ggaattccat atgatggagc caccttcat tgggaagg 38

<210> 12

<211> 34

15 <212> ADN

<213> Constructo sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(34)

20 <400> 12

cccaagctta ttattacgcc aggcggccac catc 34

<210> 13

	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Constructo sintético		
	<220>		
5	<221> misc_feature		
	<222> (1)...(34)		
	<400> 13		
	cccaagctta ttattacgcc aggcggccac catc		34
10	<210> 14		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Constructo sintético		
	<220>		
15	<221> misc_feature		
	<222> (1)...(35)		
	<400> 14		
	ggaattccat atgatgtctg ctacttcgaa cgctc		35
20	<210> 15		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Constructo sintético		
	<220>		
25	<221> misc_feature		
	<222> (1)...(33)		
	<400> 15		
	ccgctcagat tattaacac cgaatccggt gtc		33
30	<210> 16		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Constructo sintético		
	<400> 16		
35	cacatgcatg cagatgtctg ctacttcgaa cgctc		35

<210> 17

<211> 34

<212> ADN

<213> Constructo sintético

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(34)

<400> 17

gccccgagctc ttattaaaca ccgaatccgt tgtc

34

10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Constructo sintético

15 <400> 18

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

<210> 19

<211> 12

20 <212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 19

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

25 <210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 20

30

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

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

ES 2 386 380 T3

<213> Constructo sintético

<400> 21

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

5 <210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 22

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

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

15 <213> Constructo sintético

<400> 23

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

<210> 24

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 24

Gly Tyr Ser Val Thr Leu Ala
1 5

25

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Constructo sintético

30 <400> 25

Gly Tyr Asn Val Thr Leu Ala
1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Constructo sintético

5 <400> 26

Gly Tyr Ser Val Thr Leu Val
1 5

<210> 27

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 27

Gly Tyr Asn Val Thr Leu Val
1 5

15 <210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 28

20 Phe Lys Gly Ala Pro Leu Pro Ala
1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Constructo sintético

<400> 29

Phe Lys Ala Ala Pro Leu Pro Ala
1 5

<210> 30

30 <211> 6

<212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 30

Phe Val Ser Asn Ala Gly
1 5

<210> 31

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 31

Phe Phe Ser Asn Ala Gly
1 5

10 <210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 32

15 Phe Val Cys Asn Ala Gly
1 5

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Constructo sintético

<400> 33

Phe Val Ala Asn Ala Gly
1 5

<210> 34

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 34

Ser Pro Ile Ala Leu Thr Lys Ala Leu
1 5

30 <210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 35

Ser Pro Val Ala Leu Thr Lys Thr Ile
1 5

5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Constructo sintético

10 <400> 36

Ser Pro Ile Ala Leu Thr Lys Thr Leu
1 5

<210> 37

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 37

Ser Pro Val Ala Met Thr Lys Ala Leu
1 5

20 <210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 38

Ser Gln Ile Ala Leu Thr Lys Ala Leu
1 5

25

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Constructo sintético

<400> 39

Ala Val Tyr Ser Ala Ser Lys
1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Constructo sintético

5 <400> 40

Ala Val Tyr Ser Ala Thr Lys
1 5

<210> 41

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 41

Pro Ile Lys Gly Trp Ile
1 5

15 <210> 42

<211> 6

<212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 42

20 Pro Ile Ser Gly Trp Ile
1 5

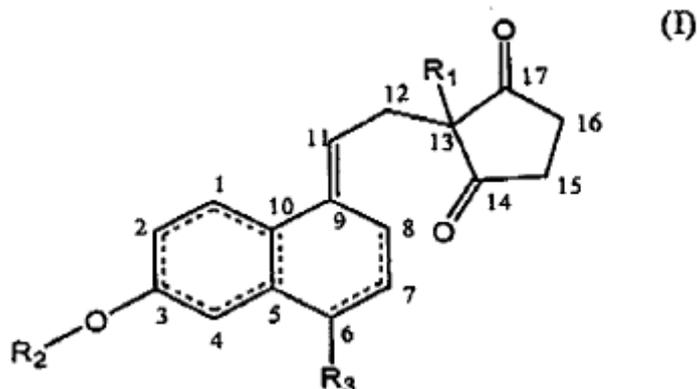
25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona de fórmula general I



en la que

5 R_1 es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4 ,

R_2 es hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_8 o un grupo protector de OH conocido en el estado de la técnica, como un éster,

R_3 es hidrógeno, un grupo metilo o un haluro,

el elemento estructural



10 representa un anillo de benceno o un anillo C_6 con 0, 1 o 2 dobles enlaces C-C,

que contiene en las posiciones 6/7 o 7/8 eventualmente un doble enlace y el carbono en las posiciones 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 y 16 está independientemente sustituido con hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_4 , un haluro o un grupo fenilo,

en el que el derivado de secodiona se reduce con una oxidorreductasa/deshidrogenasa en presencia de NADH o NADPH como cofactor,

15 caracterizado porque el derivado de secodiona se utiliza a una concentración ≥ 10 g/l en el lote de reacción y porque el cofactor NAD o NADP oxidado formado por la oxidorreductasa/deshidrogenasa se regenera continuamente.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la oxidorreductasa/deshidrogenasa

a) presenta una secuencia de aminoácidos en la que al menos un 50% de los aminoácidos son idénticos a cualquiera de las secuencias aminoacídicas de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5,

b) está codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10 o

c) está codificada por una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con las SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10.

25

3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la oxidorreductasa/deshidrogenasa presenta una longitud de 230 a 260 aminoácidos y comprende una o varias de las secuencias parciales seleccionadas del grupo compuesto las secuencias de SEQ ID NO:18 a SEQ ID NO:42:

nalvtgasrgig, nalvtggsrgig, nalityggsrgig, nalitygasrgig, nalityggsrgmg, halvtgasrgig,

30 gysvtla, gynvtla, gysvtlv, gynvtlv,

fkgaplpa, fkaaplpa,

fvsnag, ffsnag, fvcnag, fvanag,

spialtkal, spvaltkti, spialtktl, spvamtkal, sqialtkal,

avysask, avysatk,

5 pikgwi y pisgwi.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el cofactor oxidado NAD o NADP se regenera mediante la oxidación de un alcohol.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque para la regeneración del cofactor se usa un alcohol secundario de fórmula general R_xR_yCHOH en la que R_x y R_y son independientemente entre sí un grupo alquilo C_1-C_8 ramificado o no ramificado y $C_{\text{totales}} \geq 3$.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque para la regeneración del cofactor se usa un alcohol del grupo que consiste en 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol, 5-metil-2-hexanol, ciclohexanol o 2-octanol.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque para la regeneración del cofactor se añade adicionalmente una oxidorreductasa/deshidrogenasa.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el TTN, es decir el número de recambio total = mol de derivado de secodiona reducida/ml de cofactor utilizado, es $\geq 10^3$.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque se lleva a cabo en un sistema bifásico acuoso-orgánico.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se utiliza adicionalmente un disolvente orgánico, preferiblemente dietiléter, *terc*-butilmetiléter, diisopropiléter, dibutiléter, acetato de etilo, acetato de butilo, heptano, hexano, tolueno, diclorometano, ciclohexano o mezclas de los mismos.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque se utiliza como disolvente orgánico dietiléter, *terc*-butilmetiléter, diisopropiléter, dibutiléter, acetato de etilo, acetato de butilo, heptano, hexano, tolueno, diclorometano, ciclohexano o una mezcla de los mismos.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el derivado de secodiona se utiliza en una cantidad de 10 g/l a 500 g/l, referida al volumen total, preferiblemente de 25 g/l a 300 g/l, con especial preferencia de 50 g/l a 200 g/l, en el lote de reacción.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque el derivado de secodiona se utiliza en una cantidad de 25 g/l a 300 g/l, referida al volumen total, en el lote de reacción.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque el derivado de secodiona se utiliza en una cantidad de 50 g/l a 200 g/l, referida al volumen total, en el lote de reacción.

15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque se utiliza como derivado de secodiona 13-etil-3-metoxi-8,14-seco-gona-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14,17-diona, es decir, etilsecodiona- fórmula III.

16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque se utiliza como derivado de secodiona 13-metil-3-metoxi-8,14-seco-gona-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14,17-diona, es decir, metilsecodiona- fórmula II.