

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 706**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12P 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2007 E 11177932 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2410047**

54 Título: **Oxidorreductasa y su uso para la reducción de derivados de secodiona**

30 Prioridad:

07.12.2006 AT 20272006

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.11.2016

73 Titular/es:

**CAMBREX IEP GMBH (100.0%)
Rheingastrasse 190-196
65203 Wiesbaden , DE**

72 Inventor/es:

**GUPTA, ANTJE;
TSCHENTSCHER, ANKE y
DUPONT, MARIA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 588 706 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).

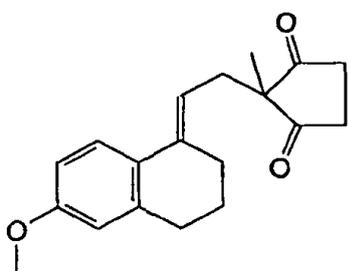
DESCRIPCIÓN

Oxidorreductasa y su uso para la reducción de derivados de secodiona

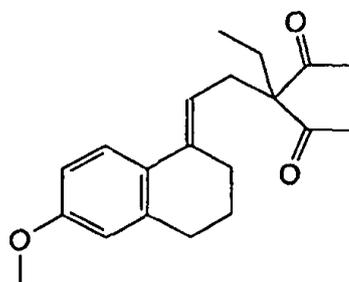
La presente invención se refiere a una oxidorreductasa para la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona de fórmula general I, en la que el derivado de secodiona se reduce con una oxidorreductasa/deshidrogenasa en presencia de NADH o NADPH como cofactor.

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 está volviéndose cada vez más importante, sobre todo porque ésta permite también la introducción de elementos estructurales que no están contenidos en esteroides de origen natural.

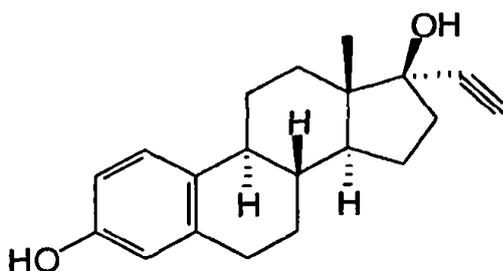
Los componentes clave de la síntesis total de esteroides enantioméricamente puros son a este respecto compuestos de fórmula general I que se designan también como secoesteroides, 8,14-seco-gona-tetraen-14,17-dionas o secodionas. Son representantes especiales de este grupo, por ejemplo, los compuestos 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).



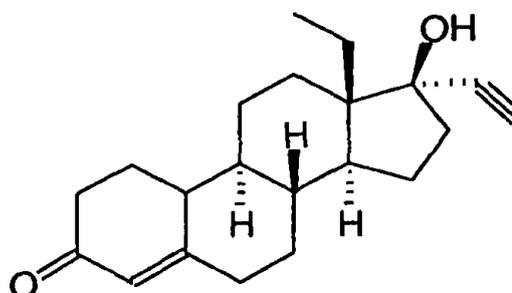
Fórmula II



Fórmula III



Fórmula IV

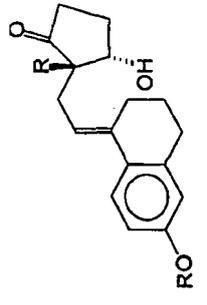
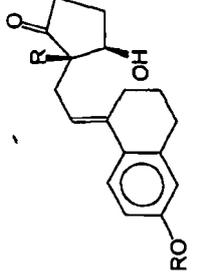
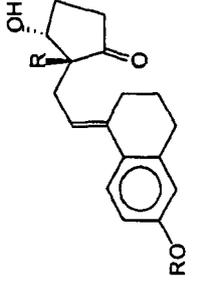
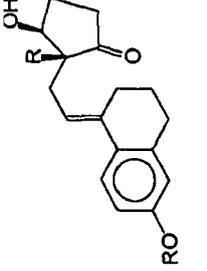


Fórmula V

La etapa clave en la preparación 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 para dar el grupo hidroxilo. Los compuestos hidroxisecoesteroides ópticamente activos resultantes (secoles, fórmulas VI a IX) pueden procesarse a continuación mediante ciclación con mantenimiento de la quiralidad para dar compuestos esteroideos quirales.

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

30

	<p>Fórmula IX (14-alfa-OH)</p>
	<p>Fórmula VIII (14-beta-OH)</p>
	<p>Fórmula VII (17-alfa-OH)</p>
	<p>Fórmula VI (17-beta-OH)</p>

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* pueden reducir secodionas para dar los distintos compuestos de hidroxilo (documentos US 3616226, US 1252524, US 3616225).

10 Particularmente, las levaduras del género *Saccharomyces*, como por ejemplo, *S. uvarum*, pueden usarse ventajosamente para preparar, 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 preferentemente para dar el correspondiente 14-alfa-hidroxisecoesteroide (Acta Microbiol. Acad. Sci. hung. 22, 463-471 (1975)). Se describe además la formación de 14-alfa-hidroxisecoesteroide también mediante reducción de secodiona por medio de *Bacillus thuringiensis* (Kosmol *et al.*; Liebigs Ann. Chem. 701, 199 (1967)).

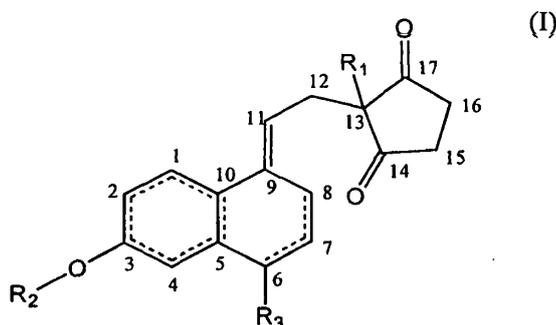
15 Los principios activos gestagénicos y estrogénicos encuentran una amplia aplicación en el mundo como anticonceptivos y en terapia de sustitución hormonal. Hasta ahora, la mayoría de las síntesis de derivados estrogénicos y gestagénicos se basan en el principio de reacción anteriormente descrito, cuya etapa clave representa la reducción enantioselectiva de secodionas para dar los correspondientes 17-beta-hidroxisecoesteroides.

20 La reducción estereoselectiva de los derivados de secodiona se realiza 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, 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.

25 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 oxidorreductasas con las que pueda conseguirse la reducción de derivados de secodiona.

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

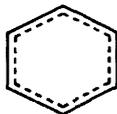
35 El alcance de protección de la invención se determina por las reivindicaciones 1 a 3. En un primer aspecto se soluciona este objetivo de acuerdo con la invención mediante una oxidorreductasa para la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona de fórmula general I,



40 El documento EP 1 152 054 B1 divulga un polinucleótido, un polipéptido codificado por el polinucleótido y un procedimiento para la reducción asimétrica de (S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo para dar (3R,5S)-6-cloro-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo, catalizándose la reacción de reducción por medio del polipéptido. El polinucleótido y el polipéptido pueden derivarse de microorganismos del género *Candida*, en particular de la especie *Candida magnoliae* IFO 0705. En la que las estructuras de anillo no comprenden heteroátomos o comprenden uno o varios heteroátomos,

45 R₁ es hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄,
R₂ es hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₈ o un grupo protector de OH, tal como un éster,
R₃ es hidrógeno, un grupo metilo o un haluro,

el elemento estructural



5 representa un anillo de benceno o un anillo C_6 con 0, 1 o 2 dobles enlaces C-C, en las posiciones 6/7 o 7/8 está contenido 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, reduciendo la oxidorreductasa/deshidrogenasa el derivado de secodiona en presencia de NADH o NADPH como cofactor.

El derivado de secodiona se usa en una concentración de >10 g/l en la mezcla de reacción y el cofactor NAD o NADP oxidado formado por la oxidorreductasa/deshidrogenasa se regenera continuamente.

10 Este procedimiento representa una mejora esencial de la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona frente al estado de la técnica. La oxidorreductasa de acuerdo con la invención permite la reducción de derivados de secodiona para dar los distintos hidroxisecoesteroides correspondientes con enzimas libres en intervalos de concentración que superan con mucho los descritos en el estado de la técnica. En un segundo aspecto se usa una oxidorreductasa de acuerdo con la invención para la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona de fórmula general I, reduciéndose el derivado de secodiona con una oxidorreductasa/deshidrogenasa en presencia de NADH o NADPH como cofactor, y la oxidorreductasa/deshidrogenasa

15 a) presenta una secuencia de aminoácidos, en la que al menos el 80 % de los aminoácidos son idénticos con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o
 b) se codifica por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 8 y se codifica por una secuencia de ácido nucleico, que hibrida con la SEQ ID NO: 8 en condiciones rigurosas, comprendiendo las condiciones rigurosas la
 20 hibridación en solución NaCl 0,7-1 M a 60 °C.

Se han identificado por los inventores oxidorreductasas que pueden reducir derivados de secodiona para dar hidroxisecoesteroides y que pueden prepararse industrialmente de forma recombinante. Mediante la oxidorreductasa de acuerdo con la invención pueden conseguirse concentraciones de sustrato esencialmente mayores que en el procedimiento de célula entera usado actualmente.

25 En el procedimiento puede usarse la oxidorreductasa con la secuencia SEQ ID NO: 3 o un polipéptido que puede derivarse de este polipéptido o bien totalmente purificado, parcialmente purificado o como células que contienen el polipéptido SEQ ID NO: 3. Las células usadas pueden presentarse a este respecto en forma nativa, permeabilizada o lisada. Preferentemente, las oxidorreductasas o derivados que pueden derivarse de las mismas se sobreexpresan en un organismo huésped adecuado, como por ejemplo *Escherichia coli*, y se usa el polipéptido recombinante para
 30 la reducción de los derivados de secodiona de fórmula general I.

Una secuencia de ADN no de acuerdo con la invención de SEQ ID NO: 6, que codifica un polipéptido con la SEQ ID NO: 1, puede obtenerse por ejemplo a partir del genoma del organismo *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635.

Una secuencia de ADN no de acuerdo con la invención de SEQ ID NO: 7, que codifica un polipéptido con la SEQ ID NO: 2, puede obtenerse por ejemplo a partir del genoma del organismo *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941.

35 Una secuencia de ADN SEQ ID NO: 8, que codifica un polipéptido con la SEQ ID NO: 3, puede obtenerse a partir de una levadura *Candida magnoliae* CBS 6396.

Las oxidorreductasas de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 no de acuerdo con la invención pueden obtenerse por ejemplo mediante cribado de homología a partir de *Candida magnoliae* DSMZ 70638. Se entiende por una secuencia de ácido nucleico que hibrida, por ejemplo, con la SEQ ID NO: 6 en condiciones rigurosas, un
 40 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 realiza tal como se describe por ejemplo en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) o publicaciones similares.
 45

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.

50 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, presenta al menos un 80 % de identidad de secuencia con las secuencias de polinucleótidos SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, preferentemente al menos un 95 % de identidad.

En otro aspecto, en un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona de fórmula general I se reduce el derivado de secodiona con una oxidorreductasa/deshidrogenasa en presencia de NADH o NADPH como cofactor, en el que la oxidorreductasa/deshidrogenasa presenta una longitud de 230 a 260 aminoácidos y comprende una o varias de las secuencias parciales, seleccionadas del grupo constituido por [las

5 secuencias 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,
 10 spialtkal, spvaltkti, spialtktl, spvamtkal, sqialtkal,
 avysask, avysatk,
 pikgwi y pisgwi.

En los procedimientos se usa 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.

15 El término "NAD" significa dinucleótido de nicotinamida y adenina, el término "NADH" dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido.

De acuerdo con una forma de realización del procedimiento, en el que se usa el derivado de secodiona en una concentración de >10 g/l en la mezcla de reacción y se regenera continuamente el cofactor NAD o NADP oxidado formado por la oxidorreductasa/deshidrogenasa, presenta la oxidorreductasa/deshidrogenasa

20 a) una secuencia de aminoácidos, en la que al menos un 80 % de los aminoácidos son idénticos con aquellos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o
 b) se codifica la oxidorreductasa/deshidrogenasa por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 8.

De acuerdo con otra forma de realización del procedimiento, en el que se usa el derivado de secodiona en una concentración de >10 g/l en la mezcla de reacción y se regenera continuamente el cofactor NAD o NADP oxidado formado por la oxidorreductasa/deshidrogenasa, presenta la oxidorreductasa/deshidrogenasa una longitud de 230 a 260 aminoácidos y comprende una o varias de las secuencias parciales, seleccionadas del grupo constituido por [las secuencias 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, spialtkal, spvaltkti, spialtktl, spvamtkal, sqialtkal, avysask, avysatk, pikgwi y pisgwi. Preferentemente, en el procedimiento de acuerdo con el segundo y tercer aspecto se regenera continuamente el cofactor NAD o NADP oxidado formados por la oxidorreductasa/deshidrogenasa.

30 con el segundo y tercer aspecto se regenera continuamente el cofactor NAD o NADP oxidado formados por la oxidorreductasa/deshidrogenasa.

De acuerdo con una forma de realización de los procedimientos se regenera el cofactor NAD o NADP oxidado mediante oxidación de un alcohol.

Se usan como cosustrato preferentemente a este respecto alcoholes primarios y secundarios, tales 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 del 5 % al 95 % en volumen, con respecto al volumen total.

35 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 del 5 % al 95 % en volumen, con respecto al volumen total.

Preferentemente, se usa para la regeneración del cofactor un alcohol secundario con la 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 $C_{\text{totales}} \geq 3$.

40 $C_{\text{totales}} \geq 3$.

De acuerdo con otra forma de realización de los procedimientos se añade para la regeneración del cofactor adicionalmente una oxidorreductasa/deshidrogenasa.

Las alcohol deshidrogenasas dependientes de NADH adecuadas pueden obtenerse, 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), a partir 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, tales como 2-propanol (isopropanol), 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-octanol o ciclohexanol.

50 o ciclohexanol.

Las alcohol secundario deshidrogenasas adecuadas para la regeneración del NADPH son por ejemplo aquéllas 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 aquéllas que se describen a partir de *Thermoanaerobium brockii*, *Thermoanaerobium ethanolicus* o *Clostridium beijerinckii*.

55 o aquéllas que se describen a partir de *Thermoanaerobium brockii*, *Thermoanaerobium ethanolicus* o *Clostridium beijerinckii*.

- 5 Para la regeneración del cofactor, pueden usarse en principio también otros sistemas enzimáticos. Por ejemplo, puede realizarse la regeneración del cofactor por medio de formiato deshidrogenasa dependiente 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 tales como formiato de amonio, formiato de sodio o formiato de calcio.
- 10 El TTN (número de recambio total = mol de compuesto de secodiona reducida/mol de cofactor usado) alcanzado en los procedimientos se encuentra generalmente en el intervalo de 10^2 a 10^5 , preferentemente asciende éste sin embargo a $\geq 10^3$.
- De acuerdo con una forma de realización se realizan los procedimientos en un sistema orgánico acuoso de dos fases.
- 15 De acuerdo con esto se realiza la reacción del derivado de secodiona en un sistema de dos fases, que contiene, por ejemplo, un 2-alcohol para la regeneración del cofactor, una oxidorreductasa, agua, cofactor y el compuesto de secodiona. Sin embargo, pueden estar contenidos aún disolventes orgánicos adicionales que no participan en la regeneración del cofactor, es decir, que no contienen grupos hidroxilo oxidables. Preferentemente se usan 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.
- 20 La proporción de componentes orgánicos inmiscibles con agua del sistema de dos fases puede ascender a este respecto a del 10 % al 90 %, preferentemente a del 20 % al 80 %, con respecto al volumen total de la mezcla de reacción. La proporción acuosa puede ascender a del 90 % al 10 %, preferentemente a del 80 % al 20 %, con respecto al volumen total de la mezcla de reacción.
- 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 aún iones para la estabilización o activación de ambas enzimas, por ejemplo iones magnesio o iones cinc.
- 25 Además, pueden usarse en los procedimientos aún otros aditivos para la estabilización de la enzima usada, por ejemplo glicerina, sorbitol, 1,4-D,L-ditiotreitol (DTT) o dimetilsulfóxido (DMSO).
- La concentración del cofactor NAD(P)H, con respecto a la fase acuosa, asciende a de 0,001 mM a 10 mM, en particular a de 0,01 mM a 1,0 mM. La temperatura puede ascender, dependiendo de las propiedades especiales de las enzimas usadas, a de 10 °C a 70 °C, preferentemente a de 20 °C a 35 °C.
- 30 Los derivados de secodiona que van a reducirse son por regla general difícilmente solubles en agua. El sustrato puede presentarse por tanto durante la reacción completa o también incompletamente disuelto. Si el sustrato no está completamente disuelto 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.
- 35 El derivado de secodiona de fórmula general I se usa en los procedimientos preferentemente en una cantidad de 10 g/l a 500 g/l, preferentemente de 25 g/l a 300 g/l, de manera especialmente preferente de 50 g/l a 200 g/l, con respecto al volumen total, en la mezcla de reacción.
- Las formas de realización preferentes de la invención están caracterizadas además porque se usa 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).
- 40 Los procedimientos se realizan, 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 una atmósfera, por ejemplo, de nitrógeno o aire. Según el compuesto de secodiona usado y la oxidorreductasa, el tiempo de reacción asciende a de una hora a 7 días, en particular a de 2 horas a 48 horas. En este tiempo, se reduce el compuesto de secodiona en al menos un 50 % para dar el correspondiente compuesto hidroxisecoesteroideo.
- 45 La presente invención se explica en más detalle a continuación por medio de ejemplos.

Ejemplo 1 (no de acuerdo con la invención)

Clonación de una oxidorreductasa de *Chloroflexus auratiacus* DSM 635

A) Cultivo de *Chloroflexus auratiacus* DSM 635

- 50 Se cultivaron células de *Chloroflexus auratiacus* DSM 635 en el siguiente medio (pH 8,2) a 48 °C en un incubador de bacterias a la luz: 0,1 % de extracto de levadura, 0,1 % de glicil-glicina, 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) al 0,01 %, 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, $\text{CoCl}_2 \times 6$

H₂O 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

5 Se extrajo ADN genómico según el procedimiento descrito en "Molecular Cloning" de Maniatis & 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).

10 Se realizó 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:

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

20 Se restringió 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 *Nde I* e *Hind III*, o con las endonucleasas *Sph I* e *Hind III* y se ligó en 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 sometió a ensayo el 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 *Nde I* e *Hind III* para determinar la presencia de un inserto de 750 pb de tamaño. Se sometieron las preparaciones de plásmido de los clones positivos para el 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 de acuerdo con la invención)

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

30 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 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. El lisado obtenido se usó entonces diluido para las correspondientes mediciones. 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 adición de 100 µl de una solución de sustrato 40 100 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

45 Cultivo de organismos y cribado tras reacción reductora 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 se cultivaron las levaduras sin regulación del pH adicional a 25 °C con un agitador a 140 revoluciones por minuto.

Se sometió a ensayo la reacción reductora de etilsecodiona de fórmula III para dar el correspondiente compuesto hidroxiseoesteroideo en las siguientes preparaciones de biotransformación de célula entera:

se agitaron 400 mg de células recién recogidas en una mezcla de reacción 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 las mezclas de reacción con 1 ml de diclorometano, se centrifugaron, se secaron con nitrógeno y se proporcionaron suspendidas en acetonitrilo para el análisis de HPLC.

Los resultados del cribado se resumen en la tabla 1.

N.º de cepa	Microorganismo	Reacción de etilsecodiona después de 24 h con cepas Wt
		Mezcla de reacción 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 %

- 5 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.

Ejemplo 4

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

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

- 10 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, equilibradas con 3 ml de fenol (pH 7,0). Se trató la mezcla de reacción total entonces respectivamente con 30 s de vórtex y 30 s de enfriamiento sobre hielo alternativamente durante en total 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 adición de 1/10 vol. de LiCl₂ 5 M a -20 °C durante 4 h.
- 15 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 Gold y se cribó para determinar la actividad de una ADH. Por medio de 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.
- 20
- 25

B) Síntesis de un transcrito de longitud completa que codifica una ADH de cadena corta de *Candida magnoliae* CBS 6396 mediante PCR

- 30 Se construyeron cebadores específicos para una posterior clonación del transcrito de longitud completa en el sistema de expresión oportuno. A este respecto se modificó el cebador en 5' con una secuencia de reconocimiento de *Nde I* o *Sph I* y el cebador en 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 realizó 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:
- 35

- 40
- | | |
|---------------|--------------|
| ciclo 1: | 94 °C, 2 min |
| ciclo 2 x 30: | 94 °C, 15 s |
| | 58 °C, 30 s |
| | 68 °C, 75 s |
| ciclo 3: | 68 °C, 7 min |
| | 4 °C, ∞ |

Se restringió el producto de PCR resultante después de purificación sobre gel de agarosa al 1 % con ayuda de las endonucleasas *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 pET21 a (Novagen) o pQME70. Después de la transformación de 2 μ l de la preparación de ligamiento en células Top 10 F' de *E. coli* (Invitrogen), se sometió a ensayo el 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* para determinar la presencia de un inserto de 750 pb de tamaño. Se secuenciaron los constructos de expresión 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

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

Se transformaron células de *Escherichia coli* competentes StarBL21 (De3) (Invitrogen) o RB791 (reserva genética de *E. coli*, Yale, EE.UU.) con los constructos de expresión pET21-MgIV o pQME70-MgIV, que codifican la oxidorreductasa. 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 μ g/ml o kanamicina 40 μ g/ml, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5, medida a 550 nm. Se indujo la expresión de proteína recombinante mediante adición de tiogalactósido de isopropilo (IPTG) en una concentración de 0, 1 mM. Después de 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 μ l de tampón TEA 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 1 mM y 500 μ l de perlas de vidrio y se disgregaron durante 10 min mediante un molino de bolas. El lisado obtenido se usó entonces diluido para las correspondientes mediciones.

El ensayo de actividad estaba compuesto como sigue: 960 μ l de tampón TEA 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 1 mM, 160 μ g de NADPH, 10 μ l de lisado celular diluido. Se inició la reacción mediante adición de 10 μ l 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 (no de acuerdo con la invención)

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

Para la reducción de etilsecodiona (fórmula III) se incubó en un recipiente de reacción una mezcla de 800 μ l 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 mezclado constante. Después de 96 h se redujo >90 % de la etilsecodiona (fórmula III) usada.

Tras finalizar 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.

La reacción de la etilsecodiona para dar 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 eluyente. Para la analítica se empleó un gradiente lineal de la proporción de acetonitrilo en el eluyente del 30 % al 70 %. La identificación de los productos de reacción se realizó mediante comparación con sustancias de referencia.

Ejemplo 7 (no de acuerdo con la invención)

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

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

Tras finalizar 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) por medio de la oxidorreductasa de SEQ ID NO: 3

5 Para la reducción de etilsecodiona (fórmula III) se incubó en un recipiente de reacción una mezcla de 100 μ l de tampón (trietanolamina 100 mM, pH = 7, MgCl₂ 2 mM), 400 μ l de 4-metil-2-pentanol, 0,02 mg de NADP, 25 mg de etilsecodiona (fórmula III) y 100 μ l de suspensión enzimática de la oxidorreductasa de SEQ ID NO: 3 (véase el ejemplo 3) durante 72 h a temperatura ambiente con mezclado constante. Después de 72 h se redujo >95 % de la etilsecodiona (fórmula III) usada para dar el compuesto de hidroxilo.

Ejemplo 9 (no de acuerdo con la invención)

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

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

Ejemplo 10 (no de acuerdo con la invención)

Reducción de etilsecodiona (fórmula III) por medio de 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 μ l 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 mezclado constante. Después de 72 h se redujo >90 % de la etilsecodiona (fórmula III) usada para dar el compuesto de hidroxilo.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> IEP GmbH

<120> Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona

<130> I 12274A

<140> EP 11177932.8

25 <141> 2007-12-07

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 252

30 <212> PRT

<213> *Chloroflexus auratiacus*

<400> 1

ES 2 588 706 T3

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 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

<210> 2
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> *Rubrobacter xylanophilus*
 <400> 2

5

ES 2 588 706 T3

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
 180 185 190

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

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

Thr Asp Asp Gly Tyr Ala Glu Phe Lys
 245

<210> 3
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> *Candida magnoliae*
 <400> 3

5

ES 2 588 706 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

<210> 4
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> *Candida magnoliae*
 <400> 4

5

ES 2 588 706 T3

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

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
 <212> PRT
 <213> *Candida magnoliae*

5

<400> 5

ES 2 588 706 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

<210> 6
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> *Chloroflexus aurantiacus*
 <400> 6

ES 2 588 706 T3

atggagccac ctttcattgg gaaggttgcg ctggtcaccg gcgcagcagc cggatttgg 60
 cgtgcttcag cactggcggtt tgcccgtgag ggtgccaaagg ttgtcgttgc tgatgtgaat 120
 gtcgagggcg ggaagagac gattgcgctg tgtcgggctt tgaataccga tgcaatgttc 180
 gtgctgttg atgtttcgca acgcatgaa gtggagcgat 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 cggtcgccgg tctggccgga tcacgtggcg tttcggcgta tgtagccagc 480
 aagcacggta ttgttggtat taccaaagcg gcagcccttg agtatgcgcg taacggattt 540
 cgtgtcaacg caatctgtcc aggtacgatt catactgcga tgatcgaccg ctttaccag 600
 ggtgatcccc aactgcttgc ccagttcgct gaggggtgaac cgattggctg gctcggctcg 660
 cctgaagagg tcgccaatgc ggtgatctgg ctctgctcag ataaggcttc gtttgtgacc 720
 ggagcgacac tggcggttga tggtgccgc ctggcgtaa 759

<210> 7
 <211> 750
 <212> ADN
 <213> *Rubrobacter xylanophilus*

5

<400> 7
 atgctcgagg ggaaggtcgc ggtcatcacg ggggccggaa gcggcatagg ccgggccacc 60
 gcgctcaagt tcgcccgcga gggggcccgg gtcgtcgccg ccgagctcga cgagcgcggc 120
 ggggaggggg tggccggga ggtgcgcagc ctcgggggcg aggcggtctt cgtccggacc 180
 gacgtctcgg agttcgcgca ggtggaggac gccgtcgagc gggcggtcgg ggagtacggc 240
 accctcgacg tgatgttcaa caacgccggc atcgggcaact acgccccct gctggagcac 300
 gagcccgagc actacgaccg ggtggtccgg gtgaaccagt acggcgtcta ctacgggata 360
 ctgcgcccg ggagaaagat ggtcgccctg aagaaccccg gcttgatcat caacaccgcc 420
 tcggtctacg ccttcctcgc ctcgccgggg gtcacggct accacgccgc caagggggcg 480
 gtcaagatga tgaccaggc ggcggcgtg gagctcgccc cgcacggcat aagggtcgtc 540
 gccatcgccc cgggcggggt ggacaccccc atcatccagg gctacaagga catggggctc 600
 ggcgagaggc tggcccggcg ccagatgcgc cgcgggtcc agacccccga gcagatcgcc 660
 ggggcggctg ccctgctcgc caccgacgag gccgacgcca taaacggctc ggtggtcatg 720
 accgacgacg gctacgcgga gttcaagtag 759

<210> 8
 <211> 732
 <212> ADN
 <213> *Candida magnoliae*

10

<400> 8

ES 2 588 706 T3

atgtctgcta cttcgaacgc tttatcact ggtgccagcc gcggaatggg cgaggccaca 60
gctattaagc ttgcccttga ggggtacagc gtcacccttg catcacgcgg tattgagcag 120
ctcaatgccca tcaaggaaaa actaccatc gtgaagaagg gccagcagca ctacgtttgg 180
cagctcgatc ttagtgacat cgaggcggct tccaccttca agggggctcc tctgcctgcc 240
agcagctacg acgtgttctt cagcaacgcc ggtgtggtgg actttgctcc gttcgcagac 300
caaagcgaga ctgcgcaaaa ggacctgtt acggttaacc tgctgtcgcc tgttgcggtg 360
accaagacca ttgttaaggc catcgccgac aagccccgcg agacgcctgc tcacattatc 420
ttcacctcgt ccattgtcgg aattcgcggg gttcccaacg tggcggctca cagcgcacc 480
aagggcgcga ttgacagctt tgcgcgctcg cttgctcgtg agttcggctcc caagaacatc 540
cacgttaact gcgtgaaccc gggcacgacg cgcaccgaga tgacaaaggg cgttgatctc 600
gcggttttcg gcgatgttcc tatcaagggc tggatcgagg tcgatgcgat tgccgacgct 660
gtgctgtttt tgatcaagtc caagaacatc actggccagt cgctcgttgt tgacaacgga 720
ttcgggtgtt aa 732

<210> 9
<211> 726
<212> ADN
<213> *Candida magnoliae*

5

<400> 9

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

<210> 10
<211> 726
<212> ADN
<213> *Candida magnoliae*

10

<400> 10

ES 2 588 706 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 ggcgtcgctg cgttctcgcc cacagccgac      300
cacgatgata aggagtggca gaacttgctt gccgtgaact tgtcgtcgcc cattgccctc      360
acgaaggccc tcttgaagga tgtctccgaa aggcctgtgg acaagccact gcagattatc      420
tacatttcgt cgggtgccgg cttgcatggc gccgcgcagg tcgccgtgta cagtgcattc      480
aaggccggtc ttgatggttt tatgcgctcc gtcgcccgctg aggtgggccc gaagggcatc      540
catgtgaact ccatcaaccc cggatacacg aagactgaaa tgaccgcggg cattgaagcc      600
cttcctgatt tgcctatcaa ggggtggatc gagcccgagg caattgctga cgcggttctg      660
tttctggcaa agtccaagaa taccaccggc acaaacattg tggtcgacaa tggcttgatt      720
gcttaa                                          726

```

- 5 <210> 11
- <211> 38
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(38)
- 10 <223> cebador para la clonación de gen de oxidorreductasa de SEQ ID NO: 6 de *Chloroflexus aurantiacus* en vector de expresión

- <400> 11
- ggaattccat atgatggagc cacctttcat tgggaagg 38

- 15 <210> 12
- <211> 34
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(34)
- 20 <223> cebador para la clonación de gen de oxidorreductasa de SEQ ID NO: 6 de *Chloroflexus aurantiacus* en vector de expresión

- <400> 12
- cccaagctta ttattacgcc aggcggccac catc 34

- 25 <210> 13
- <211> 38
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(38)
- 30 <223> cebador para la clonación de gen de oxidorreductasa de SEQ ID NO: 6 de *Chloroflexus aurantiacus* en vector de expresión

- <400> 13
- 35 cacatgcatg cagatggagc cacctttcat tgggaagg 38

ES 2 588 706 T3

<210> 14
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> cebador para la clonación de gen de oxidorreductasa de SEQ ID NO: 8 de *Candida magnoliae* en vector de expresión

10 <400> 14
 ggaattccat atgatgtctg ctacttcgaa cgctc 35

<210> 15
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(33)
 <223> cebador para la clonación de gen de oxidorreductasa de SEQ ID NO: 8 de *Candida magnoliae* en vector de expresión

20 <400> 15
 ccgctcgagt tattaacac cgaatccgtt gtc 33

<210> 16
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> cebador para la clonación de gen de oxidorreductasa de SEQ ID NO: 8 de *Candida magnoliae* en vector de expresión

30 <400> 16
 cacatgcatg cagatgtctg ctacttcgaa cgctc 35

<210> 17
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(34)
 <223> cebador para la clonación de gen de oxidorreductasa de SEQ ID NO: 8 de *Candida magnoliae* en vector de expresión

40 <400> 17
 gcccgagctc ttattaaca ccgaatccgt tgtc 34

<210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(12)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

50 <400> 18

ES 2 588 706 T3

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

5 <210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1) . . (12)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

10 <400> 19

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

15 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(12)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

20 <400> 20

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

25 <210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(12)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

30 <400> 21

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

35 <210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(12)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

40 <400> 22

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

45 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

Gly Tyr Asn Val Thr Leu Val
1 5

5 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(8)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

10 <400> 28

Phe Lys Gly Ala Pro Leu Pro Ala
1 5

15 <210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(8)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

20 <400> 29

Phe Lys Ala Ala Pro Leu Pro Ala
1 5

25 <210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(6)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

30 <400> 30

Phe Val Ser Asn Ala Gly
1 5

35 <210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(6)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

40 <400> 31

Phe Phe Ser Asn Ala Gly
1 5

45 <210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(6)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

5 <400> 32

Phe Val Cys Asn Ala Gly
1 5

<210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(6)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

15 <400> 33

Phe Val Ala Asn Ala Gly
1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(9)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

25 <400> 34

Ser Pro Ile Ala Leu Thr Lys Ala Leu
1 5

<210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

30

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(9)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

35 <400> 35

Ser Pro Val Ala Leu Thr Lys Thr Ile
1 5

<210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

40

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(9)
 <223> secuencia parcial de oxidorreductasa

45 <400> 36

ES 2 588 706 T3

Ser Pro Ile Ala Leu Thr Lys Thr Leu
1 5

5 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(9)
<223> secuencia parcial de oxidorreductasa
10 <400> 37

Ser Pro Val Ala Met Thr Lys Ala Leu
1 5

15 <210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(9)
<223> secuencia parcial de oxidorreductasa
20 <400> 38

Ser Gln Ile Ala Leu Thr Lys Ala Leu
1 5

25 <210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(7)
<223> secuencia parcial de oxidorreductasa
30 <400> 39

Ala Val Tyr Ser Ala Ser Lys
1 5

35 <210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(7)
<223> secuencia parcial de oxidorreductasa
40 <400> 40

Ala Val Tyr Ser Ala Thr Lys
1 5

45 <210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> secuencia artificial

ES 2 588 706 T3

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(6)
<223> secuencia parcial de oxidorreductasa

5 <400> 41

Pro Ile Lys Gly Trp Ile
1 5

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> secuencia artificial

10

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(6)
<223> secuencia parcial de oxidorreductasa

15 <400> 42

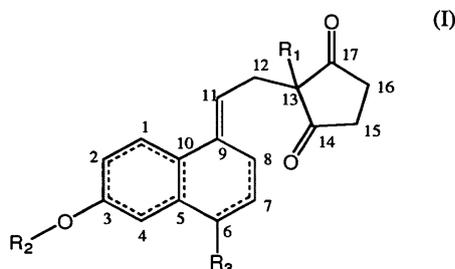
Pro Ile Ser Gly Trp Ile
1 5

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido con actividad oxidorreductasa que

- a) presenta la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o
- b) es codificado por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 8 y reduce derivados de secodiona de fórmula general I

5



en la que las estructuras de anillo no comprenden heteroátomos o comprenden uno o varios heteroátomos,

R₁ es hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄,

R₂ es hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₈ o un grupo protector de OH, tal como un éster,

R₃ es hidrógeno, un grupo metilo o un haluro,

el elemento estructural

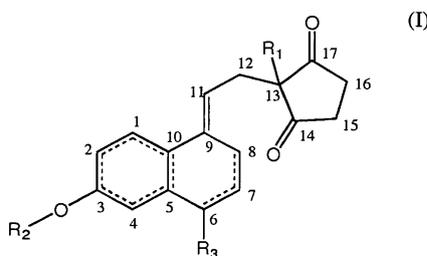
10



representa un anillo de benceno o un anillo C₆ con 0, 1 o 2 dobles enlaces C-C, en las posiciones 6/7 o 7/8 está contenido dado el caso 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, en presencia de NADH o NADPH como cofactor.

15

2. Polipéptido con actividad oxidorreductasa que reduce derivados de secodiona de fórmula general I



en la que las estructuras de anillo no comprenden heteroátomos o comprenden uno o varios heteroátomos,

R₁ es hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄,

R₂ es hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₈ o un grupo protector de OH, tal como un éster,

R₃ es hidrógeno, un grupo metilo o un haluro,

el elemento estructural

20



representa un anillo de benceno o un anillo C₆ con 0, 1 o 2 dobles enlaces C-C, en las posiciones 6/7 o 7/8 está contenido 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, en presencia de NADH o NADPH como cofactor y es codificado por una secuencia de ácido nucleico que presenta con la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 8 al menos un 80 % de identidad e híbrida en condiciones rigurosas, comprendiendo las condiciones rigurosas la hibridación en solución de NaCl 0,7-1 M a 60 °C.

25

30

3. Polipéptido aislado según las reivindicaciones 1 o 2, que puede obtenerse de *Candida magnoliae* CBS 6396.