

(19)



österreichisches
patentamt

(10)

AT 503 017 A4 2007-07-15

(12)

Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer:

A 2027/2005

(51) Int. Cl.⁸: C12P 7/02 (2006.01),
C12N 15/53 (2006.01),
C12N 9/04 (2006.01)

(22) Anmeldetag:

19.12.2005

(43) Veröffentlicht am:

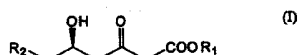
15.07.2007

(73) Patentanmelder:

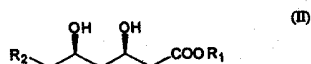
IEP GMBH
D-65203 WIESBADEN (DE)

(54) VERFAHREN ZUR ENANTIOSELEKTIVEN ENZYMATISCHEN REDUKTION VON HYDROXYKETOVERBINDUNGEN

(57) Bei einem Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion eines Hydroxyketons der allgemeinen Formel I



in welcher R₁ = C₁-C₆-Alkyl und R₂ = -C₁, -CN, -OH, -H oder C₁-C₆-Alkyl, zu einem chiralen Diol der allgemeinen Formel II



in welcher R₁ und R₂ dieselbe Bedeutung wie in Formel I besitzen, wird das Hydroxyketon mit einer Oxidoreduktase in Gegenwart eines Co-faktors reduziert, wobei die Oxidoreduktase

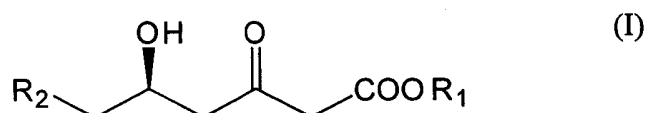
- a) eine Aminosäuresequenz aufweist, bei welcher mindestens 50% der Aminosäuren mit jenen der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 identisch sind,
- b) von der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 codiert wird, oder
- c) von einer Nukleinsäuresequenz codiert wird, die mit SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

AT 503 017 A4 2007-07-15

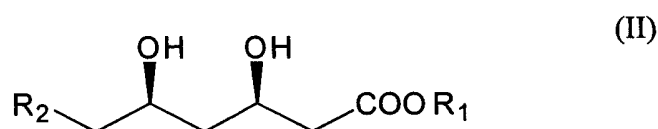
Zusammenfassung:

Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion von Hydroxyketoverbindungen

Bei einem Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion eines Hydroxyketons der allgemeinen Formel I



in welcher $\text{R}_1 = \text{C}_1\text{--C}_6\text{-Alkyl}$ und $\text{R}_2 = \text{--Cl, --CN, --OH, --H}$ oder $\text{C}_1\text{--C}_6\text{-Alkyl}$, zu einem chiralen Diol der allgemeinen Formel II



in welcher R_1 und R_2 dieselbe Bedeutung wie in Formel I besitzen, wird das Hydroxyketon mit einer Oxidoreduktase in Gegenwart eines Cofaktors reduziert, wobei die Oxidoreduktase

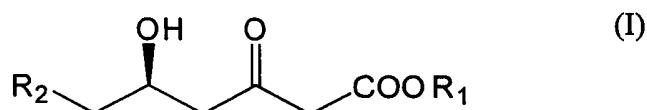
a) eine Aminosäuresequenz aufweist, bei welcher mindestens 50% der Aminosäuren mit jenen der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 identisch sind,

b) von der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 codiert wird, oder

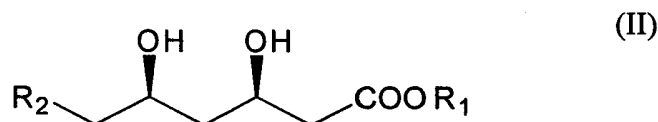
c) von einer Nukleinsäuresequenz codiert wird, die mit SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion von Hydroxyketoverbindungen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion eines Hydroxyketons der allgemeinen Formel I



in welcher $\text{R}_1 = \text{C}_1\text{--C}_6\text{-Alkyl}$ und $\text{R}_2 = \text{--Cl, --CN, --OH, --H}$ oder $\text{C}_1\text{--C}_6\text{-Alkyl}$, zu einem chiralen Diol der allgemeinen Formel II



in welcher R_1 und R_2 dieselbe Bedeutung wie in Formel I besitzen, wobei das Hydroxyketon mit einer Oxidoreduktase in Gegenwart eines Cofaktors reduziert wird.

Chirale Diole der allgemeinen Formel II sind wichtige Zwischenverbindungen bei der Herstellung von Medikamenten, insbesondere bei der Herstellung von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren. Solche chiralen Diole sind beispielsweise tert-Butyl (3R,5S)-6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoat, tert-Butyl (3R,5R)-6-cyano-3,5-dihydroxyhexanoat oder tert-Butyl (5S,3R)-3,5,6-trihydroxyhexanoat.

Diole dieser Art werden insbesondere durch enantioselektive Reduktion der entsprechenden Hydroxyketone der Formel I, wie z.B. tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat, tert-Butyl (5S)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat oder tert-Butyl (5S)-5,6-dihydroxy-3-oxohexanoat, hergestellt. Die chemisch katalysierte Reduktion hat dabei den Nachteil, dass sie einerseits aufgrund der harschen Reaktionsbedingungen zu Nebenprodukten führen kann, andererseits unbefriedigende Enantiomeren- bzw. Diastereomerenüberschüsse liefert und technisch nur sehr aufwendig durchführbar ist.

Aus diesem Grund ist man schon länger um biokatalytische Verfahren bemüht, welche die enantioselektive Reduktion der genannten Hydroxyketone erlauben. Biokatalytische Verfahren arbeiten gewöhnlich unter milden Bedingungen, weshalb zu erwarten ist, dass sie die Reduktion der ohnehin recht instabilen 5-Hydroxy-3-oxohexanoat-Derivate ohne

Entstehung weiterer Nebenprodukte ermöglichen. Bislang konnten jedoch noch keine geeigneten Biokatalysatoren gefunden werden, mit denen die enzymatische Reduktion der genannten 5-Hydroxy-3-oxohexanoat-Derivate effektiv und mit isolierten Enzymen möglich ist.

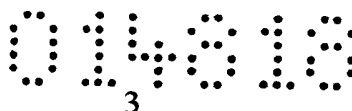
Die US-Patentschrift 6,001,615 und die internationale Patentanmeldung WO 01/85975 A1 beispielsweise beschreiben die Reduktion von tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat bzw. tert-Butyl (5S)-5,6-dihydroxy-3-oxohexanoat mit verschiedenen Hefen der Gattung *Beauveria*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces* und *Torulaspora*. Die Umsetzungen erfolgen dabei allerdings nur mit ganzen Zellen der Wildstämme und können daher nur in sehr geringen Konzentrationen von weit unter 5 % durchgeführt werden. Die für die Umsetzungen verantwortlichen Enzyme und DNA-Sequenzen konnten bisher noch nicht identifiziert werden.

Mikrobielle Umsetzungen strukturell ähnlicher Verbindungen sind desweiteren in der EP 0 569 998 B1 beschrieben. Hier konnte sogar ein NADH-abhängiges Enzym aus *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 33305 aufgereinigt werden, welches auch isoliert gemeinsam mit Glucosedehydrogenase zur Coenzymregenerierung eingesetzt wird. Im beschriebenen Verfahren wird das Substrat in Konzentrationen von 1 % eingesetzt und eine „total turn over number“ des NADH von nur 10 erreicht. Ein industriell anwendbares Verfahren wurde nicht aufgezeigt.

In der US-Patentschrift 6,645,746 B1 wird eine Aminosäuresequenz aus *Candida magnoliae* offenbart, die genutzt werden kann, um mit Hilfe von NADPH tert-Butyl (5S)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat zu tert-Butyl (3R,5S)-6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoat zu reduzieren. In der Beschreibung dieses Dokuments wird das Enzym bevorzugt coexprimiert mit Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* eingesetzt, wobei die Regenerierung des Cofaktors NADPH mit Hilfe der Glucosedehydrogenase und mit Glucose als Cosubstrat erfolgt.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, ein Verfahren bereitzustellen, das die wirtschaftliche Herstellung enantiomerenreiner Diole der allgemeinen Formel II in hoher Ausbeute und hoher Enantiomerenreinheit ohne Nebenprodukte ermöglicht.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren der eingangs genannten Art gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass die Oxidoreduktase



- a) eine Aminosäuresequenz aufweist, bei welcher mindestens 50% der Aminosäuren mit jenen der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 identisch sind,
- b) von der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 codiert wird, oder
- c) von einer Nukleinsäuresequenz codiert wird, die mit SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

Es wurde gefunden, dass das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 Oxidoreduktaseaktivität aufweist und verwendet werden kann, um tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat zu tert-Butyl (3R,5R)-6-cyano-3,5-dihydroxyhexanoat mit einem Diastereomerenüberschuss von > 99 % zu reduzieren. In gleicher Weise können andere Hydroxyketone der allgemeinen Formel I mittels Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 reduziert werden.

Eine DNA-Sequenz SEQ ID NO:2, die für ein Polypeptid mit der SEQ ID NO:1 kodiert, ist beispielsweise aus dem Genom des Organismus *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941 erhältlich. Außerdem wurde gefunden, dass die DNA-Sequenz SEQ ID NO:3 verwendet werden kann, um das Polypeptid der SEQ ID NO:1 in *Escherichia* zu exprimieren.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Reduktion von Hydroxyketonen der allgemeinen Formel I zu Diolen der allgemeinen Formel II unter Verwendung eines Polypeptides mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 oder eines Polypeptides, das eine Aminosäuresequenz aufweist, welche mindestens zu 50 % mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 identisch ist, also eines Polypeptides, das durch Substitution, Insertion, Deletion oder Addition von mindestens einer Aminosäure von SEQ ID NO:1 ableitbar ist, oder unter Verwendung eines Polypeptides, welches von der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 oder von einer Nukleinsäuresequenz codiert wird, welche unter stringenten Bedingungen mit SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 hybridisiert.

Unter einer Nukleinsäuresequenz, welche mit der SEQ ID NO:2 bzw. SEQ ID NO:3 unter stringenten Bedingungen hybridisiert, versteht man ein Polynukleotid, welches mittels der Kolonie-Hybridisierungsmethode, der Plaque-Hybridisierungsmethode, der Southern-Hybridisierungsmethode oder Vergleichbarem unter Verwendung der SEQ ID NO:2 bzw. SEQ ID NO:3 als DNA-Sonde identifiziert werden kann.

Zu diesem Zweck wird das an einem Filter immobilisierte Polynukleotid mit der SEQ ID NO:2 (bzw. SEQ ID NO:3) in einer 0,7-1 M NaCl-Lösung bei 60°C hybridisiert. Die Hybridisierung wird, wie z.B. in Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition

(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) oder ähnlichen Publikationen beschrieben, durchgeführt. Anschließend wird der Filter mit 0,1 bis 2-facher SSC-Lösung bei 65°C gewaschen, wobei unter 1-facher SSC-Lösung ein Gemisch, bestehend aus 150 mM NaCl und 15 mM Natriumcitrat, verstanden wird.

Im erfindungsgemäßen Verfahren können das Polypeptid mit der Sequenz SEQ ID NO:1 bzw. von diesem Polypeptid ableitbare Polypeptide entweder vollständig gereinigt, teilweise gereinigt oder als Zellen, enthaltend das Polypeptid SEQ ID NO:1, eingesetzt werden. Die eingesetzten Zellen können dabei nativ, permeabilisiert oder lysiert vorliegen. Bevorzugt werden das Polypeptid mit der Sequenz SEQ ID NO:1 bzw. davon ableitbare Derivate in einem geeigneten Wirtsorganismus, wie beispielsweise *Escherichia coli*, überexprimiert und das rekombinante Polypeptid zur Reduktion des Hydroxyketons der allgemeinen Formel I eingesetzt.

Je kg umzusetzender Verbindung der Formel I werden 5000 bis 10 Mio U Oxidoreduktase SEQ ID NO:1 bzw. deren Derivate eingesetzt. (nach oben offen). Die Enzymeinheit 1 U entspricht dabei jener Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 µmol des Hydroxyketons der Formel I je Minute (min) umzusetzen.

Die erfindungsgemäße enzymatische Reduktion läuft unter milden Bedingungen ab, so dass die Zersetzung des oft instabilen Hydroxyketons und somit die Entstehung unerwünschter Nebenprodukte weitgehend verhindert werden kann. Das erfindungsgemäße Verfahren weist eine hohe Standzeit und eine Diastereomerenreinheit von in der Regel > 99 % der hergestellten chiralen Diole auf.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass der im Verfahren verwendete Cofaktor kontinuierlich mit einem Cosubstrat reduziert wird. Vorzugsweise wird als Cofactor NADH eingesetzt, wobei das bei der Reduktion gebildete NAD mittels Cosubstrat wieder zu NADH reduziert wird.

Als Cosubstrat werden dabei bevorzugt primäre und sekundäre Alkohole, wie Ethanol, 2-Propanol, 2-Butanol, 2-Pentanol, 3-Pentanol, 4-Methyl-2-pentanol, 2-Heptanol, 2-Octanol oder Cyclohexanol eingesetzt. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird 2-Propanol zur Coenzymregenerierung eingesetzt. Der Anteil des Cosubstrates für die Regenerierung kann 5 bis 95 Vol%, bezogen auf das Gesamtvolumen, betragen.

Die Coenzymregenerierung erfolgt beispielsweise ebenfalls durch das Polypeptid mit der SEQ ID NO:1.

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

Außerdem kann die Cofactorregenerierung mittels NAD- oder NADP-abhängiger Formiat-Dehydrogenase (Tishkov et al., J. Biotechnol. Bioeng. [1999] 64, 187-193, Pilot-scale production and isolation of recombinant NAD and NADP specific formate dehydrogenase) durchgeführt werden. Geeignete Cosubstrate der Formiat-Dehydrogenase sind beispielsweise Salze der Ameisensäure, wie Ammoniumformiat, Natriumformiat oder Calciumformiat.

Die Hydroxyketon der allgemeinen Formel I wird im erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise in einer Menge von 3% bis 50% (Gewichtsprozent), bezogen auf das Gesamtvolumen, eingesetzt, bevorzugt von 5% bis 30%, insbesondere von 8% bis 20%.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass als Hydroxyketon der allgemeinen Formel (I) tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat, tert-Butyl (5S)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat oder tert-Butyl (5S)-5,6-dihydroxy-3-oxohexanoat eingesetzt wird.

Der wässrige Anteil des Reaktionsgemisches, in dem die enzymatische Reduktion abläuft, enthält bevorzugt einen Puffer, beispielsweise Kaliumphosphat-, Tris/HCl- oder Triethanolamin-Puffer, mit einem pH-Wert von 5 bis 10, vorzugsweise pH 6 bis 9. Der Puffer kann zusätzlich noch Ionen zur Stabilisierung oder Aktivierung der Enzyme enthalten, wie beispielsweise Zinkionen oder Magnesiumionen.

Die Temperatur beträgt während der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zweckmäßig etwa 10°C bis 70°C, bevorzugt 20°C bis 45°C.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die enzymatische Umsetzung in Anwesenheit eines mit Wasser nicht oder nur beschränkt mischbaren organischen Lösungsmittels durchgeführt. Dieses Lösungsmittel ist beispielsweise ein symmetrischer oder unsymmetrischer Di(C₁-C₆)alkylether, ein geradkettiges oder verzweigtes Alkan oder Cycloalkan oder ein wasserunlöslicher sekundärer Alkohol, der zugleich das Cosubstrat darstellt. Die bevorzugten organischen Lösungsmittel sind Diethylether, tertiär-Butylmethylether, Diisopropylether, Dibutylether, Butylacetat, Heptan, Hexan, 2-Oktanol, 2-Heptanol, 4-Methyl-2-pentanol und Cyclohexanol. Das Lösungsmittel kann in diesem Fall auch gleichzeitig als Cosubstrat zu Cofaktorregenerierung dienen.

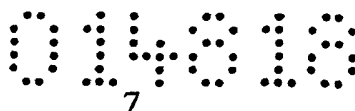
Der Reaktionsansatz besteht beim Einsatz wasserunlöslicher Lösungsmittel bzw. Cosubstrate aus einer wässrigen und einer organischen Phase. Das Hydroxyketon verteilt sich entsprechend seiner Löslichkeit zwischen organischer und wässriger Phase. Die organische Phase hat allgemein einen Anteil von 5 bis 95%, bevorzugt von 10 bis 90%, bezogen auf das gesamte Reaktionsvolumen. Die zwei flüssigen Phasen werden bevorzugt mechanisch gemischt, so dass eine große Oberfläche zwischen ihnen erzeugt wird. Auch in dieser Ausführungsform kann z.B. das bei der enzymatischen Reduktion gebildete NAD mit einem Cosubstrat, wie oben beschrieben, wieder zu NADH reduziert werden.

Die Konzentration des Cofaktors, insbesondere NADH bzw. NADPH, in der wässrigen Phase beträgt allgemein 0,001 mM bis 10 mM, insbesondere 0,01 mM bis 1 mM.

Im erfindungsgemäßen Verfahren kann auch ein Stabilisator der Oxidoreduktase/Dehydrogenase eingesetzt werden. Geeignete Stabilisatoren sind beispielsweise Glycerin, Sorbitol, 1,4-DL-Dithiothreit (DTT) oder Dimethylsulfoxid (DMSO).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird beispielsweise in einem geschlossenen Reaktionsgefäß aus Glas oder Metall durchgeführt. Dazu werden die Komponenten einzeln in das Reaktionsgefäß überführt und unter einer Atmosphäre von beispielsweise Stickstoff oder Luft gerührt.

Gemäß einer weiteren möglichen Ausführungsform der Erfindung kann das oxidierte Cosubstrat (beispielsweise Aceton) kontinuierlich entfernt werden und/oder das Cosubstrat (beispielsweise 2-Propanol) kontinuierlich neu zugeführt werden, um das



Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Reaktionsproduktes (Diol der allgemeinen Formel II) zu verschieben.

In einer weiteren Ausführungsform kann die Zugabe der Oxidoreduktase gemäß SEQ ID NO:1 und/oder des Cosubstrates im Prozessverlauf auch schrittweise erfolgen.

Nach Beendigung der Reduktion wird das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Dazu wird die wässrige Phase gegebenenfalls von der organischen Phase abgetrennt und die das Produkt enthaltende organische Phase filtriert. Die wässrige Phase kann gegebenenfalls auch extrahiert und wie die organische Phase weiter aufgearbeitet werden. Danach wird das Lösungsmittel aus der organischen Phase verdampft und das Diol der allgemeinen Formel II als Rohprodukt erhalten. Das Rohprodukt kann dann weiter aufgereinigt oder direkt für die Synthese eines Folgeproduktes verwendet werden.

Die Erfindung wird nachstehend anhand von Beispielen weiter erläutert.

Beispiel 1

Klonierung einer Oxidoreduktase aus *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941

A) Anzucht von *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941

Zellen von *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941 wurden in folgendem Medium bei 50°C (pH 7,2) und 140 rpm in einem Bakterien-Schüttler kultiviert: 0,1 % Hefeextrakt, 0,1 % Trypton, 0,004 % $\text{CaSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,02 % $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,01 % Nitrilotriessigsäure, 100 ml Phosphat-Puffer [5,44 g/l KH_2PO_4 , 43 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$], 500 µl/l 0,01 M Fe-Citrat, 500 µl/l Trace Element [500 µl/l H_2SO_4 , 2,28 g/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 500 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 500 mg H_3BO_3 , 25 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 25 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 45 mg/l $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$]. Am Tag 6 der Kultivierung wurden Zellen mittels Zentrifugation vom Kultur-Medium separiert und bei -80°C gelagert.

B) Amplifikation des für selektive Oxidoreduktase kodierenden Gens

Genomische DNA wurde nach der in „Molecular Cloning“ von Manniatis & Sambrook beschriebenen Methode extrahiert. Die resultierende Nukleinsäure diente als Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern, die von der in der NCBI-Datenbank unter der Nummer 46106817 publizierten Gen-Sequenz abgeleitet wurden. Dabei

wurden die Primer für eine nachfolgende Klonierung in einen Expressionsvektor 5'-terminal mit Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen *Nde I* und *Hind III*, bzw. *Sph I* versehen (SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7).

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

Zyklus 1: 94°C, 2 min

Zyklus 2 x 30: 94°C, 15 sec

54°C, 30 sec

68°C, 60 sec

Zyklus 3: 68°C, 7 min

4°C, ∞

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

Beispiel 2

Effiziente Expression des Polypeptides SEQ ID NO:1 in *Escherichia coli*-Zellen

Für die effiziente Expression des Polypeptides SEQ ID NO:1 in *Escherichia coli*-Zellen wurde kodierende DNA SEQ ID NO:3 für die Klonierung in einen Expressionsvektor als Matrize in einer PCR-Reaktion verwendet. Diese DNA-Sequenz unterschied sich im Bereich der ersten 160 Basenpaare von der zuvor bekannten DNA-Sequenz (SEQ ID NO:2) in 51 Basen. Diese Modifizierung war konservativ und führte nicht zur Veränderung der Aminosäuresequenz.

Die Amplifizierung wurde in einem PCR-Puffer [10 mM Tris-HCl, (pH 8,0); 50 mM KCl; 10 mM MgSO₄; 1 mM dNTP Mix; je 20 pMol Primer (SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:5) und 2,5 U Platinum Pfx DNA-Polymerase (Invitrogen)] mit 50 ng DNA SEQ ID NO:3 als Matrize und folgenden Temperatur-Zyklen durchgeführt:

Zyklus 1: 94°C, 2 min

Zyklus 2 x 30: 94°C, 40 sec

56°C, 30 sec

68°C, 60 sec

Zyklus 3: 68°C, 7 min

4°C, ∞

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

Beispiel 3

Herstellung der Oxidoreduktase aus *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941

Die mit dem Expressionskonstrukt transformierten *Escherichia coli*-Stämme BL21 Star (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), bzw. RB791 (*E.coli* genetic stock, Yale, USA) wurden in Medium (1% Tryptone, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl) mit Ampicillin (50 µg/ml), kultiviert, bis eine optische Dichte von 0,5, gemessen bei 550 nm, erreicht war. Die Expression von rekombinantem Protein wurde durch Zugabe von Isopropylthiogalaktosid (IPTG) in einer Konzentration von 0,1 mM induziert. 16 Stunden nach der Induktion bei 25°C und 220 rpm wurden die Zellen geerntet und bei -20°C eingefroren.

Zur Enzymgewinnung wurden 30 g Zellen in 150 ml Triethanolaminpuffer (100 mM, pH = 7, 2 mM MgCl₂, 10 % Glycerin) suspendiert und mittels Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Die Enzymlösung wurde anschließend mit 150 ml Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

Die derart erhaltene Enzymlösung wurde zur Synthese von tert-Butyl (3R,5R)-6-cyano-3,5-dihydroxyhexanoat eingesetzt.

Die erhaltene Enzymlösung wurde verdünnt auch für die entsprechenden enzymatischen Messungen eingesetzt. Der Aktivitätstest setzte sich dabei wie folgt zusammen: 870 µl 100 mM TEA-Puffer, pH 7,0, 160 µg NAD(P)H, 10 µl verdünntes Zelllysate. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl der 100 mM Substratlösung tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat zum Reaktionsgemisch gestartet.

Beispiel 4

Umsetzung von tert-Butyl (5R)-6-Cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat zu tert-Butyl (3R,5R)-6-cyano-3,5-dihydroxyhexanoat mittels Oxidoreduktase SEQ ID NO:1

Für die Umsetzung von tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat zu tert-Butyl (3R,5R)-6-cyano-3,5-dihydroxyhexanoat wurde im Eppendorfreaktionsgefäß ein Gemisch aus 900 µl Puffer (100 mM TEA, pH = 7, 1 mM MgCl₂), 100 µl 2-Propanol, 10 µl tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat-Rohprodukt (Enantiomerenreinheit >99 %), 0,1 mg NAD und 100 µl Enzymsuspension (siehe Beispiel 3) für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 96 % des eingesetzten tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat zu tert-Butyl (3R,5R)-6-cyano-3,5-dihydroxyhexanoat reduziert. Der Diastereomenüberschuss betrug > 99 %.

Die Bestimmung des Umsatzes sowie des Diastereomenüberschusses erfolgte mittels chiraler Gas-Chromatographie. Dazu wurde ein Gas-Chromatograph GC-17A von Shimadzu mit einer chiralen Trennsäule CP-Chirasil-DEX CB (Varian Chrompack, Darmstadt, Deutschland), einem Flammen-Ionisations-Detektor und Helium als Trägergas benutzt.

Die Trennung von tert-Butyl-6-cyano-3,5-dihydroxyhexanoat erfolgte bei 0,72 bar und 10 min bei 50°C, 5°C/min → 200°C für 10 min.

Die Retentionszeiten betrugen: (R-BCH) 4,4 min; (R,R-BCH) 47,1 min und (R,S-BCH) 48,2 min.

Beispiel 5

Synthese von tert-Butyl (3R,5R)-6-cyano-3,5-dihydroxyhexanoat aus tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat mittels Oxidoreduktase SEQ ID NO:1

Für eine weitere Umsetzung des tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat zu tert-Butyl (3R,5R)-6-cyano-3,5-dihydroxyhexanoat wurde im Eppendorfreaktionsgefäß ein Gemisch aus 550 µl Puffer (100 mM TEA, pH = 7, 1 mM MgCl₂), 150 µl 2-Propanol, 200 µl tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat-Rohprodukt (Enantiomerenreinheit >99 %), 0,1 mg NAD und 200 µl Enzymsuspension (siehe Beispiel 3) inkubiert. Im Verlauf der Reaktion wurde das entstandene Aceton/2-Propanolgemisch mehrfach durch Einleiten von Stickstoff verdampft und frisches 2-Propanol und 50 µl Enzym wurden zugegeben. Nach 2- bis 3-facher Wiederholung im Abstand von 24 h waren > 90 % des eingesetzten tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat zu tert-Butyl (3R,5R)-6-cyano-3,5-dihydroxyhexanoat reduziert. Der Diastereomerenüberschuss betrug > 99 %.

*Sequenzliste**SEQ ID NO:1*

1 mlegkvavit gagsgigrat alrfaregar vvvaelderr
41 geevvreile sggeavfvrt dvsefeqvea averaveeyg
81 tldvmfnnag ighyaplleh dpehydrvvr vnqygvygi
121 laagrkmael enpgviinta svyaflaspg vigyhaskga
161 vkmmtqaaal elaphgirvv aiapggvdtg/iiggykdmgl
201 gerlargqmr rrlqtpeqia gavvllatee adaingsvwm
241 tddgyaefk

SEQ ID NO:2

1 atgctcgaggggaaggtcgcggtcatcacgggggccggca
41 gcggcataggccgggccaccgcgctcaggttcgcccgcga
81 aggggcccgggtggtcgtggcgagctcgacgagcggagg
121 ggggaggaggtcgtccgggagatcctcgagtccggcgggg
161 aggccgtcttcgtgaggacggacgtctcgagttcgagca
201 gggtgaggcccgctcgagcgccgctcgaggagtacggg
241 acgctggacgtcatgttcaacaacgccggcatcgggcact
281 acgccccctgctggagcacgacccggagcactacgaccg
321 ggtggtccgggtgaaccagtagcggtctactacgggata
361 ctgcccggcgaggaagatggccgagctggagaaccccg
401 gcgtgatcatcaacaccgcctcggtctacgcttctggtg
441 cccccgggtgatcggtatcacgcttcaagggggcg

481 gtgaagatgatgacccaggccgcagccctggagctcgccc
521 cccacggcatagcgggtcgccatcgccccgggcggggt
561 ggacaccccgatcatccagggtacaaggacatgggcctc
601 ggtgagcggctggcccgcgccagatgcgtcgaggctcc
641 agaccccgagcagatcgccggcgccgtcgtcctgctcgc
681 caccgaggaggcagacgccataaacggctcgggtggtgatg
721 accgacgacgggtacgcggagttcaagtaa

SEQ ID NO:3

1 atgctggaag gtaaagtggc agtcacc ggtgcaggca
41 gcggcattgg gcgtgccact gcgtgcgtt ttgcgcgtga
81 aggcgtcgc gtcgttggtg ccgagctgga tgaacgtcgc
121 ggtgaggaag ttgtacgtga gattctggaa tctggcgggg
161 gggaggccgt cttcgtgagg acggacgtct cggagttcga
201 gcagggtgag gccgccgtcg agcgcgccgt cgaggagtac
241 gggacgtg acgtcatgtt caacaacgcc ggcatcgggc
281 actacgcccc cctgctggag cacgaccgg agcactacga
321 ccgggtggtc cgggtgaacc agtacggcgt ctactacggg
361 atactcgccg ccggcaggaa gatggccgag ctggagaacc
401 ccggcgtgat catcaacacc gcctcgtct acgctttcct
441 ggctcccc ggtgtgatcg gctatcacgc ttccaagggg
481 gcggtgaaga tgatgacca ggccgcagcc ctggagctcg
521 cccccacgg catacgggtc gtcgcatcg ccccgggcgg
561 ggtggacacc ccgatcatcc agggctacaa ggacatgggc
601 ctcggtgagc ggctggcccc cgccagatg cgtcgaggc
641 tccagacccc cgagcagatc gccggcgccg tcgtcctgct
681 cgccaccgag gaggcagacg ccataaacgg ctcggtggtg

721 atgaccgacg acggctacgc ggagttcaag taa

SEQ ID NO:4

GGGAATTCCATATGATGCTCGAGGGGAAGGTCG

SEQ ID NO:5

CCCAAGCTTATTACTTGAACTCCGCGTAGCCGTC

SEQ ID NO:6

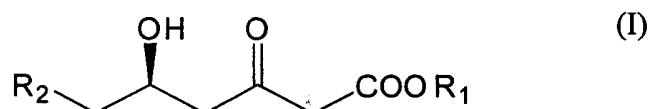
CCTAGCTAGCATGCTGGAAGGTAAAGTGGC

SEQ ID NO:7

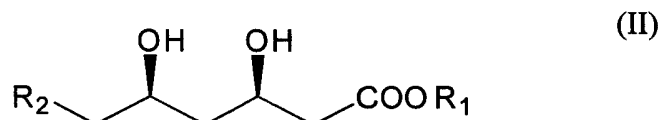
CACATGCATGCGAATGCTCGAGGGGAAGGTC

Patentansprüche:

1. Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion eines Hydroxyketons der allgemeinen Formel I



in welcher $\text{R}_1 = \text{C}_1\text{--C}_6\text{-Alkyl}$ und $\text{R}_2 = \text{--Cl, --CN, --OH, --H}$ oder $\text{C}_1\text{--C}_6\text{-Alkyl}$, zu einem chiralen Diol der allgemeinen Formel II



in welcher R_1 und R_2 dieselbe Bedeutung wie in Formel I besitzen, wobei das Hydroxyketon mit einer Oxidoreduktase in Gegenwart eines Cofaktors reduziert wird, dadurch gekennzeichnet, dass die Oxidoreduktase

- a) eine Aminosäuresequenz aufweist, bei welcher mindestens 50% der Aminosäuren mit jenen der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 identisch sind,
- b) von der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 codiert wird, oder
- c) von einer Nukleinsäuresequenz codiert wird, die mit SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Cofaktor kontinuierlich mit einem Cosubstrat reduziert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Cofaktor NADH eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Cosubstrat Ethanol, 2-Propanol, 2-Butanol, 2-Pentanol, 4-Methyl-2-pentanol, 2-Heptanol oder 2-Octanol eingesetzt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass zur Regenerierung des Cofaktors eine Dehydrogenase zugesetzt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyketon in einer Menge von 3-50 Gew.%, vorzugsweise 5-30 Gew.%, insbesondere 8-20 Gew.%, bezogen auf das Gesamtreaktionsvolumen, eingesetzt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Hydroxyketon der allgemeinen Formel (I) tert-Butyl (5R)-6-cyano-5-hydroxy-3-oxohexanoat, tert-Butyl (5S)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat oder tert-Butyl (5S)-5,6-dihydroxy-3-oxohexanoat eingesetzt wird.