

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
31. Mai 2012 (31.05.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/069434 A1

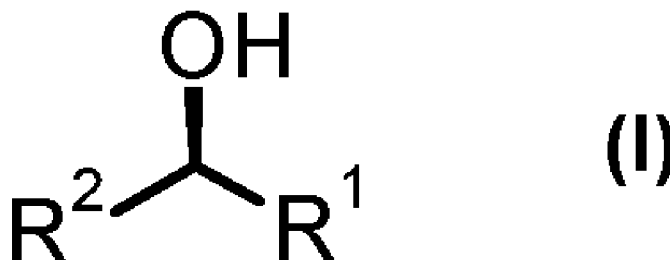
- (51) **Internationale Patentklassifikation:**
C12P 7/22 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)
- (21) **Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP2011/070607
- (22) **Internationales Anmeldedatum:**
22. November 2011 (22.11.2011)
- (25) **Einreichungssprache:** Deutsch
- (26) **Veröffentlichungssprache:** Deutsch
- (30) **Angaben zur Priorität:**
10192418.1 24. November 2010 (24.11.2010) EP
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US):** BASF SE [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US):** SCHNEIDER, Nina [DE/DE]; Carl-Blos-Str. 3, 77654 Offenburg (DE). BONNEKESSEL, Melanie [DE/DE]; Bergstr. 13d, 67067 Ludwigshafen (DE). BREUER, Michael [DE/DE]; Niebergallweg 30, 64285 Darmstadt (DE). DÄUWEL, Jürgen [DE/DE]; Schwetzingen Str. 89/5, 69124 Heidelberg (DE). DITRICH, Klaus [DE/DE]; Hermann-Sinsheimer-Weg 11, 67161 Gönheim (DE). KARL, Ulrich [DE/DE]; Bordolloring 29, 67269 Grünstadt (DE). STÄB, Tobias [DE/DE]; Rebenweg 6, 67227 Frankenthal (DE).
- (74) **Gemeinsamer Vertreter:** BASF SE; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (81) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart):** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart):** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING N-HETEROCYCLIC OPTICALLY ACTIVE ALCOHOLS

(54) **Bezeichnung :** VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG N-HETEROZYKLISCHER OPTISCH AKTIVER ALKOHOLE



(57) **Abstract:** Method for producing N-heterocyclic optically active alcohols of the formula (I), where R¹ represents alkyl groups which in turn can be monosubstituted or polysubstituted by alkyl, halogen, SH.SR³, OH, OR³, NO₂, CN, CO, COOR³, NR³R⁴ or NR³R³R⁵⁺X, where R³, R⁴ and R⁵ independently of one another are H or a low-alkyl or low-alkoxy radical and X⁻ is a counterion, R² is N-containing heteroaryl groups which in turn can be monosubstituted or polysubstituted by alkyl, halogen, SH.SR³, OH, OR³, NO₂, CN, CO, COOR³, NR³R⁴ or NR³R³R⁵⁺X, where R³, R⁴ and R⁵ independently of one another are H or a low-alkyl or low-alkoxy radical and X⁻ is a counterion, by reduction of the corresponding ketone, wherein the reduction is carried out using a dehydrogenase having the polypeptide sequence SEQ ID NO: 2 or NO: 4, or having a polypeptide sequence in which up to 25% of the amino acid radicals are modified in comparison with SEQ ID NO: 2 or NO: 4 by deletion, insertion, substitution or a combination thereof.

(57) **Zusammenfassung:** Verfahren zur Herstellung von N-heterozyklischen optisch aktiven Alkoholen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2012/069434 A1

der Formel (I), worin R^1 für Alkylgruppen stehen, die wiederum ein- oder mehrfach substituiert sein können, durch Alkyl, Halogen, $SH.SR^3.OH$, OR^3 , NO_2 , CN , CO , $COOR^3$, NR^3R^4 oder $NR^3R^3R^5X^-$, wobei R^3 , R^4 und R^5 unabhängig voneinander für H oder einen Niedrigalkyl- oder Niedrigalkoxy-Rest stehen und X^- für ein Gegenion steht, R^2 für N-haltige Heteroarylgruppen stehen, die wiederum ein- oder mehrfach substituiert sein können, durch Alkyl, Halogen, $SH.SR^3.OH$, OR^3 , NO_2 , CN , CO , $COOR^3$, NR^3R^4 oder $NR^3R^3R^5X^-$, wobei R^3 , R^4 und R^5 unabhängig voneinander für H oder einen Niedrigalkyl- oder Niedrigalkoxy-Rest stehen und X^- für ein Gegenion steht durch Reduktion des entsprechenden Ketons, wobei die Reduktion mit einer Dehydrogenase mit der Polypeptidsequenz SEQ ID NO:2 oder NO:4, oder mit einer Polypeptidsequenz, bei der bis zu 25% der Aminosäurereste gegenüber SEQ ID NO:2 oder NO:4 durch Deletion; Insertion, Substitution oder einer Kombination davon verändert sind, durchgeführt wird.

Verfahren zur Herstellung N-heterozyklischer optisch aktiver Alkohole

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von N-heterozyklischen optisch aktiven Alkoholen durch Dehydrogenasen.

5

Stand der Technik

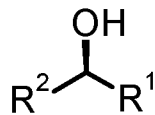
Die Funktion von Dehydrogenasen als Biokatalysatoren ist allgemein bekannt [*Chemico-Biological Interactions* (2003) 143:247, *Journal of Biological Chemistry* (2002) 277:25677]. Insbesondere die technische Anwendung dieser Enzymklasse zur Herstellung von Feinchemikalien ist dokumentiert [*Tetrahedron* (2004) 60:633, *Trends Biotechnol* (1999) 17:487]. Je nach Substrat unterscheiden sich die bekannten Dehydrogenase in ihrer Aktivität und Spezifität. Man unterscheidet sie bezüglich ihrer Stereoselektivität in sogenannte 'Prelog'- und 'anti'-Prelog-Enzyme (*Pure and Applied Chemistry*, (1964), 9:119).

So sind zur Herstellung von optisch aktiven Phenylethanolderivaten vornehmlich solche Biokatalysatoren beschrieben, die 'Prelog-Selektivität aufweisen, Enzyme, die die gegensinnige Enantioselektivität aufweisen, sind seltener, wenn auch nicht unbekannt [*Trends Biotechnol* (1999) 17:487, *J.Org.Chem.* (1992) 57:1532]

Beschreibung der Erfindung

20

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Alkoholen der Formel I



Formel I

worin

25 R^1 für Alkylgruppen stehen, die wiederum ein- oder mehrfach substituiert sein können, durch Alkyl, Halogen, SH, SR³, OH, OR³, NO₂, CN, CO, COOR³, NR³R⁴ oder NR³R³R⁵⁺X⁻, wobei R³, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander für H oder einen Niedrigalkyl- oder Niedrigalkoxy-Rest stehen und X⁻ für ein Gegenion steht

30

R^2 für N-haltige Heteroarylgruppen stehen, die wiederum ein- oder mehrfach substituiert sein können, durch Alkyl, Halogen, SH, SR³, OH, OR³, NO₂, CN, CO, COOR³, NR³R⁴ oder NR³R³R⁵⁺X⁻, wobei R³, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander für H oder einen Niedrigalkyl- oder Niedrigalkoxy-Rest stehen und X⁻ für ein Gegenion steht

35

durch Reduktion des entsprechenden Ketons, wobei die Reduktion mit einer Dehydrogenase mit der Polypeptidsequenz SEQ ID NO:2 oder NO:4, oder mit einer

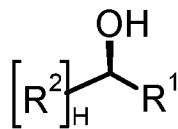
Polypeptidsequenz, bei der bis zu 25% der Aminosäurereste gegenüber SEQ ID NO:2 oder NO:4 durch Deletion; Insertion, Substitution oder einer Kombination davon verändert sind, durchgeführt wird.

5 Eine besonders gute Ausführungsform der Erfindung besteht in einem Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Alkoholen der Formel I, worin R¹, für C1-C5-Alkyl und R² für Pyridinyl, insbesondere 4-Pyridinylrest steht, wobei die Reste R1 und/oder R2 ggf. durch Halogen einfach substituiert sind.

10 Das erfindungsgemäße Verfahren ergibt optisch aktive Alkohole mit (S)-Konfiguration.

Dieses Verfahren eignet sich auch zur Herstellung von optisch aktiven Alkoholen, die N-haltige nicht-aromatische Heterozyklen enthalten, indem man anschließend an das oben dargestellte Verfahren den N-haltigen Heteroarylrest hydriert.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Alkoholen der Formel III,



Formel III

20 indem man in einem ersten Schritt (a) das Verfahren gemäß Anspruch 1 durchführt und in einem zweiten Schritt (b) den in (a) erhaltenen optisch aktiven Alkohol der Formel I durch Hydrierung in III überführt.

25 In Formel III steht R¹ für Alkylgruppen, die wiederum ein- oder mehrfach substituiert sein können, durch Alkyl, Halogen, SH, SR³, OH, OR³, NO₂, CN, CO, COOR³, NR³R⁴ oder NR³R³R⁵X⁻, wobei R³, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander für H oder einen Niedrigalkyl- oder Niedrigalkoxy-Rest stehen und X⁻ für ein Gegenion steht.

30 [R²]_H steht für gesättigte N-haltige Heterozyklen, die wiederum ein- oder mehrfach substituiert sein können, durch Alkyl, Halogen, SH, SR³, OH, OR³, NO₂, CN, CO, COOR³, NR³R⁴ oder NR³R³R⁵X⁻, wobei R³, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander für H oder einen Niedrigalkyl- oder Niedrigalkoxy-Rest stehen und X⁻ für ein Gegenion steht.

Die Hydrierung unter Schritt (b) kann mit allen dem Fachmann für die Hydrierung von Aromaten bekannten Methoden durchgeführt werden. Bevorzugt kommen hier Hydrierkatalysatoren zum

Einsatz, die die Elemente Ru, Co, Rh, Ni, Pd oder Pt enthalten (s. Yang, P., Hrsg., *The Chemistry of Nanostructured Materials*, World Scientific Publishing: Singapur, (2003); S. 329–357.)

Die Isolierung und Aufarbeitung des erhaltenen Reaktionsproduktes kann mit allen geläufigen Methoden wie Destillation, Chromatographie und Kristallisation erfolgen. Üblicherweise schließt man einen Destillationsschritt, bevorzugt eine Molekulardestillation, an. Das Produkt kann normalerweise in hoher chemischer Reinheit beispielsweise durch Kristallisation erhalten werden.

Sollte die mit den o.g. Verfahren erhaltene optische Reinheit der Alkohole für bestimmte Einsatzzwecke nicht ausreichend sein, empfiehlt sich eine weitere Aufreinigung, beispielsweise durch fraktionierte Kristallisation bzw. Diastereomerenbildung und Trennung.

Ein besonders bevorzugtes Verfahren ist für Verbindungen der Formel III mit $[R^2]_H = 4$ -Piperidinyll die Salzbildung dieses Alkohols mit einer optisch aktiven Säure, insbesondere mit (R)-Mandelsäure und die Kristallisation dieses Salzes. Anschliessend lässt sich aus den Salzen der optisch aktiven Säure der Alkohol durch Basenbehandlung wieder freisetzen.

Allgemeine Begriffe und Definitionen

Werden keine andere Angaben gemacht, so gelten folgende allgemeine Bedeutungen:

„Alkyl“ steht für geradkettige oder verzweigte Alkylreste 1 bis 10, bevorzugt 2-8, insbesondere 3-6 C-Atomen, insbesondere Methyl, Ethyl, i- oder n-Propyl, n-, i-, sec.- oder tert.-Butyl, n-Pentyl oder 2-Methyl-Butyl, n-Hexyl, 2-Methyl-pentyl, 3-Methyl-pentyl, 2-Ethyl-butyl, 2-Ethyl-hexyl.

„Halogen“ steht für Fluor, Chlor, Brom oder Jod, insbesondere Fluor oder Chlor.

„Niedrigalkyl“ steht für geradkettige oder verzweigte Alkylreste 1 bis 6 C-Atomen, wie Methyl, Ethyl, i- oder n-Propyl, n-, i-, sec.- oder tert.-Butyl, n-Pentyl oder 2-Methyl-Butyl, n-Hexyl, 2-Methyl-pentyl, 3-Methyl-pentyl, 2-Ethyl-butyl.

„N-haltige Heteroaryl“ steht für einen ein- oder mehrkernigen, vorzugsweise ein- oder zweikernigen, gegebenenfalls substituierten heteroaromatischen Rest, der mindestens ein Stickstoffatom als Bestandteil des aromatischen Systems trägt, insbesondere für ein über eine beliebige Ringposition gebundenes Pyridinyl. Die Ringgröße des N-haltigen Heteroaryl beträgt bevorzugt 5 und 6 Ringe. Das N-haltige Heteroaryl kann neben dem zwingend anwesenden einen N-Atom auch noch weitere Heteroatome ausgewählt aus N, O und S tragen. Diese N-haltigen Heteroa-

rylreste können gegebenenfalls 1, 2 oder 3 gleiche oder verschiedene Substituenten tragen, beispielsweise Halogen, Niedrigalkyl, Niedrigalkoxy gemäß obiger Definition oder Trifluormethyl. Die Verknüpfung des N-haltigen Heteroarylrestes mit den anderen Resten Verbindung gemäß Formel I kann über jede Ringposition des N-haltigen Heteroarylrestes erfolgen. Im Fall
5 von Pyridinyl als N-haltigem Heteroaryl erfolgt die Verknüpfung bevorzugt als 4-Pyridinyl.

„Enantioselektivität“ im Rahmen der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass der Enantiomere-
nüberschuss ee (in %) eines der beiden möglichen Enantiomere, wenigstens 50 %, vorzugs-
weise wenigstens 80 %, insbesondere wenigstens 90 % und speziell wenigstens 95 % beträgt.
10 Der ee-Wert berechnet sich nach:

$$ee (\%) = \frac{\text{Enantiomer A} - \text{Enantiomer B}}{\text{Enantiomer A} + \text{Enantiomer B}} \times 100$$

Biochemische Ausführungsformen

15 Besonders geeignete Dehydrogenasen (EC 1.1.X.X) sind vor allem NAD- bzw. NADP-
abhängige Dehydrogenasen (E.C. 1.1.1.x) insbesondere Alkoholdehydrogenasen (E.C.1.1.1.1
oder E.C.1.1.1.2), welche die selektive Reduktion des Ketons zum 'Prelog'-Alkohol bewirken.
Die Dehydrogenase wird bevorzugt aus einem Mikroorganismus, besonders bevorzugt aus ei-
nem Bakterium, einem Pilz, insbesondere einer Hefe, jeweils hinterlegt in Stammsammlungen
20 oder erhältlich aus Isolaten natürlicher Quelle, wie Bodenproben, Biomasseproben und derglei-
chen oder durch *de novo*-Gensynthese gewonnen.

Die Dehydrogenase kann in gereinigter oder teilweise gereinigter Form oder in Form des ur-
sprünglichen Mikroorganismus oder eines rekombinanten Wirtsorganismus, der die Dehydroge-
nase exprimiert, verwendet werden. Verfahren zur Gewinnung und Aufreinigung von Dehydro-
genasen aus Mikroorganismen sind dem Fachmann hinreichend bekannt, z.B. aus K. Nakamu-
25 ra & T. Matsuda, „Reduction of Ketones“ in K. Drauz und H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in
Organic Synthesis 2002*, Vol.III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim. Rekombinante Verfahren zur
Erzeugung von Dehydrogenasen sind ebenfalls bekannt, beispielsweise aus W. Hummel, K.
30 Abokitse, K. Drauz, C. Rollmann und H. Gröger, *Adv. Synth. Catal.* 2003, 345, Nr. 1 + 2, S. 153-
159.

Geeignete Bakterien sind beispielsweise solche der Ordnungen der *Burkholderiales*, *Hydroge-
nophilales*, *Methylophilales*, *Neisseriales*, *Nitrosomonadales*, *Procabacteriales* oder *Rhodocyc-
35 lales*.

Besonders bevorzugt werden Dehydrogenasen aus der Familie der Familie der *Rhodocycla-
ceae*.

Insbesondere bevorzugt werden Dehydrogenasen aus den Gattungen *Azoarcus Azonexus*, *Azospira*, *Azovibrio*, *Dechloromonas*, *Ferribacterium*, *Petrobacter*, *Propionivibrio*, *Quadricoccus*, *Rhodocyclus*, *Sterolibacterium*, *Thauera* und *Zoogloea*.

5

Besonders bevorzugt werden Dehydrogenasen aus Arten der Gattungen *Azoarcus*.

Üblicherweise erfolgt die Reduktion mit der Dehydrogenase in Gegenwart eines geeigneten Kofaktors (auch als Kosubstrat bezeichnet). Als Kofaktors für die Reduktion des Ketons dient üblicherweise NADH und/oder NADPH. Daneben können Dehydrogenasen als zelluläre Systeme eingesetzt werden, die inherent Kofaktor enthalten, oder alternative Redoxmediatoren zugesetzt werden (A. Schmidt, F. Hollmann und B. Bühler „Oxidation of Alcohols“ in K. Drauz und H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* 2002, Vol.III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim).

15

Üblicherweise erfolgt die Reduktion mit der Dehydrogenase außerdem in Gegenwart eines geeigneten Reduktionsmittels, welches den im Verlauf der Reduktion oxidierten Kofaktor regeneriert. Beispiele für geeignete Reduktionsmittels sind Zucker, insbesondere die Hexosen, wie Glukose, Mannose, Fructose, und/oder oxidierbare Alkohole, insbesondere Ethanol, Propanol, Butanol, Pentanol oder Isopropanol, sowie Formiat, Phosphit oder molekularer Wasserstoff. Zur Oxidation des Reduktionsmittels und damit verbunden zur Regeneration des Koenzyms kann eine zweite Dehydrogenase, wie z.B. Glukosedehydrogenase bei Verwendung von Glukose als Reduktionsmittel, Phosphitdehydrogenase bei Verwendung von Phosphit als Reduktionsmittel oder Formiat-Dehydrogenase bei der Verwendung von Formiat als Reduktionsmittel, zugesetzt werden. Diese kann als freies oder immobilisiertes Enzym oder in Form von freien oder immobilisierten Zellen eingesetzt werden. Ihre Herstellung kann sowohl separat als auch durch Koexpression in einem (rekombinanten) Dehydrogenase-Stamm erfolgen.

25

Die erfindungsgemäß verwendeten Dehydrogenasen können frei oder immobilisiert eingesetzt werden. Unter einem immobilisierten Enzym versteht man ein Enzym, das an einen inerten Träger fixiert ist. Geeignete Trägermaterialien sowie die darauf immobilisierten Enzyme sind aus der EP-A-1149849, EP-A-1 069 183 und der DE-OS 100193773 sowie aus den darin zitierten Literaturstellen bekannt. Auf die Offenbarung dieser Schriften wird diesbezüglich in vollem Umfang Bezug genommen. Zu den geeigneten Trägermaterialien gehören beispielsweise Tone, Tonmineralien, wie Kaolinit, Diatomeenerde, Perlit, Siliciumdioxid, Aluminiumoxid, Natriumcarbonat, Calciumcarbonat, Cellulosepulver, Anionenaustauschermaterialien, synthetische Polymere, wie Polystyrol, Acrylharze, Phenolformaldehydharze, Polyurethane und Polyolefine, wie Polyethylen und Polypropylen. Die Trägermaterialien werden zur Herstellung der geträgerten

35

Enzyme üblicherweise in einer feinteiligen, partikelförmigen Form eingesetzt, wobei poröse Formen bevorzugt sind. Die Partikelgröße des Trägermaterials beträgt üblicherweise nicht mehr als 5 mm, insbesondere nicht mehr als 2 mm (Sieblinie). Analog kann bei Einsatz der Dehydrogenase als Ganzzell-Katalysator eine freie oder immobilisierte Form gewählt werden. Trägermaterialien sind z.B. Ca-Alginat, und Carrageenan. Enzyme wie auch Zellen können auch direkt mit Glutaraldehyd vernetzt werden (Cross-linking zu CLEAs). Entsprechende und weitere Immobilisierungsverfahren sind beispielsweise in J. Lalonde und A. Margolin „Immobilization of Enzymes“ in K. Drauz und H. Waldmann, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2002, Vol.III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim beschrieben.

10

Die Umsetzung kann in wässrigen oder nichtwässrigen Reaktionsmedien oder in 2-Phasensystemen oder (Mikro-)Emulsionen erfolgen. Bei den wässrigen Reaktionsmedien handelt es sich vorzugsweise um gepufferte Lösungen, die in der Regel einen pH-Wert von 4 bis 8, vorzugsweise von 5 bis 8, aufweisen. Das wässrige Lösungsmittel kann neben Wasser außerdem wenigstens einen Alkohol, z.B. Ethanol oder Isopropanol oder Dimethylsulfoxid enthalten.

15

Unter nicht-wässrigen Reaktionsmedien werden Reaktionsmedien verstanden, die weniger als 1 Gew.-%, vorzugsweise weniger als 0,5 Gew.-% Wasser, bezogen auf das Gesamtgewicht des Reaktionsmediums, enthalten. Vorzugsweise wird die Umsetzung in einem organischen Lösungsmittel durchgeführt. Geeignete Lösungsmittel sind beispielsweise aliphatische Kohlenwasserstoffe, vorzugsweise mit 5 bis 8 Kohlenstoffatomen, wie Pentan, Cyclopentan, Hexan, Cyclohexan, Heptan, Octan oder Cyclooctan, halogenierte aliphatische Kohlenwasserstoffe, vorzugsweise mit einem oder zwei Kohlenstoffatomen, wie Dichlormethan, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Dichlorethan oder Tetrachlorethan, aromatische Kohlenwasserstoffe, wie Benzol, Toluol, die Xylole, Chlorbenzol oder Dichlorbenzol, aliphatische acyclische und cyclische Ether oder Alkohole, vorzugsweise mit 4 bis 8 Kohlenstoffatomen, wie Diethylether, Methyl-tert-butylether, Ethyl-tert-butylether, Dipropylether, Diisopropylether, Dibutylether, Tetrahydrofuran oder Ester wie Ethylacetat oder n-Butylacetat oder Ketone wie Methylisobutylketon oder Dioxan oder Gemische davon.

20

25

30

Beispielsweise wird die Reduktion mit der Dehydrogenase in einem wässrig-organischen, insbesondere wässrigen Reaktionsmedium durchgeführt.

Das zu reduzierende Keton wird vorzugsweise in einer Konzentration von 0,1 g/l bis 500 g/l, besonders bevorzugt von 1 g/l bis 200 g/l in die enzymatische Reduktion eingesetzt und kann kontinuierlich oder diskontinuierlich nachgeführt werden.

35

Die enzymatische Reduktion erfolgt in der Regel bei einer Reaktionstemperatur unterhalb der Desaktivierungstemperatur der eingesetzten Dehydrogenase und vorzugsweise bei wenigstens $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Besonders bevorzugt liegt sie im Bereich von 0 bis $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, insbesondere von 15 bis $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ und speziell von 20 bis $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, z.B. bei etwa $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5

Zur Durchführung kann man beispielsweise das Keton mit der Dehydrogenase, dem Lösungsmittel und gegebenenfalls den Koenzymen, gegebenenfalls einer zweiten Dehydrogenase zur Regenerierung des Koenzyms und/oder weiteren Reduktionsmitteln vorlegen und das Gemisch durchmischen, z. B. durch Rühren oder Schütteln. Es ist aber auch möglich, die Dehydrogenase(n) in einem Reaktor, beispielsweise in einer Säule, zu immobilisieren, und durch den Reaktor eine das Keton und gegebenenfalls Koenzyme und/oder Kosubstrate enthaltende Mischung zu leiten. Hierzu kann man die Mischung im Kreislauf durch den Reaktor leiten bis der gewünschte Umsatz erreicht ist. Dabei wird die Ketogruppe des Ketons zu einer OH-Gruppe reduziert, wobei im Wesentlichen eines der beiden Enantiomere des Alkohols entsteht. In der Regel wird man die Reduktion bis zu einem Umsatz von wenigstens 70% , besonders bevorzugt von wenigstens 85% und insbesondere von wenigstens 95% , bezogen auf das in der Mischung enthaltene Keton führen. Das Fortschreiten der Reaktion, d. h. die sequentielle Reduktion des Ketons, kann dabei durch übliche Methoden wie Gaschromatographie oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie verfolgt werden.

10

15

20

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft funktionale Phenylethanol Dehydrogenase-Mutanten, abgeleitet von der Phenylethanol Dehydrogenase EbN1 aus *Azoarcus* sp. mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2.

25

Besonders bevorzugt werden als Dehydrogenasen im erfindungsgemäßen Verfahren Alkohol-Dehydrogenasen mit folgenden Eigenschaften eingesetzt:

30

Alkoholdehydrogenase aus *Azoarcus* mit einer Aminosäuresequenz, gemäß SEQ ID NO:2 sowie Alkoholdehydrogenasen mit Aminosäuresequenzen, bei denen bis zu 25% , bevorzugt bis zu 15% , besonders bevorzugt bis zu 10% , insbesondere bis zu 5% der Aminosäurereste gegenüber SEQ ID NO:2 durch Deletion; Insertion, Substitution oder einer Kombination davon verändert sind.

35

Insbesondere betrifft die Erfindung funktionale Alkoholdehydrogenase-Mutanten, abgeleitet von der Alkoholdehydrogenase EbN1 aus *Azoarcus* sp. mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, wobei die Mutante wenigsten eine Mutation in wenigstens einem Sequenzbereich, ausgewählt unter

(1) Sequenzbereich 142 bis 153 (auch bezeichnet als Loop 2) und

(2) Sequenzbereich 190 bis 211 (auch bezeichnet als Helix alpha FG1)

aufweisen.

5 Insbesondere betrifft die Erfindung funktionale Alkoholdehydrogenase-Mutanten, welche zusätzlich wenigstens eine weitere Mutation in einem weiteren Sequenzbereich, ausgewählt unter

(3) Sequenzbereich 93 bis 96 (auch bezeichnet als Loop 1)

(4) Sequenzbereich 241 bis 249 (C-Terminus)

10 (5) Sequenzbereich 138 bis 141 (hydrophiler Bereich Bindungstasche, auch bezeichnet als Loop 2) und

(6) Cys61 und / oder Cys 83

aufweisen.

15

Weiterhin betrifft die Erfindung funktionale Alkoholdehydrogenase-Mutanten, abgeleitet von der Alkoholdehydrogenase EbN1 aus *Azoarcus* sp. mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, wobei die Mutante ausgewählt ist unter den in Tabelle 1 aufgelisteten Mutanten.

20 Insbesondere sind zu nennen Mutante, wobei wenigstens einer der folgenden Reste mutiert ist:

T192, L197, M200, F201, L204, M246, L139, T140, T142, L146, I148, Y151, C61, C83, L186, wobei die jeweilige Aminosäure durch eine beliebige andere natürliche Aminosäure ersetzt ist

25 Insbesondere sind erfindungsgemäße Mutanten ausgewählt unter Mutanten enthaltend wenigstens eine der folgenden Mutationen:

Y151X_A, wobei X_A = A, R, N, E, Q, G, H, I, L, M, T oder V ist;

T192X_B, wobei X_B = A, E, G, I, P, S, W, V oder L ist;

30

Weitere Abwandlungen erfindungsgemäßer Dehydrogenasen:

Erfindungsgemäß mit umfasst sind ebenfalls „funktionale Äquivalente“ der konkret offenbarten Enzyme mit Dehydrogenase-Aktivität und die Verwendung dieser in den erfindungsgemäßen Verfahren.

35

„Funktionale Äquivalente“ oder Analoga der konkret offenbarten Enzyme sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Polypeptide, welche weiterhin die gewünschte biologische Aktivität, wie z.B. Substratspezifität, besitzen. So versteht man beispielsweise unter

„funktionalen Äquivalenten“ Enzyme, die vom Keton zum entsprechenden 'anti-Prelog'-Alkohol reduzieren und die mindestens 20 %, bevorzugt 50 %, besonders bevorzugt 75 %, ganz besonders bevorzugt 90 % der Aktivität eines Enzyms, umfassend eine der unter Seq ID 2 bzw. Seq ID 4 aufgeführten Aminosäuresequenzen, aufweist. Funktionale Äquivalente sind außerdem
5 vorzugsweise zwischen pH 4 bis 10 stabil und besitzen vorteilhaft ein pH-Optimum zwischen pH 5 und 8 sowie ein Temperaturoptimum im Bereich von 20°C bis 80°C.

Unter „funktionalen Äquivalenten“ versteht man erfindungsgemäß insbesondere auch Mutanten, welche in wenigstens einer Sequenzposition der oben genannten Aminosäuresequenzen eine
10 andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der oben genannten biologischen Aktivitäten besitzen. „Funktionale Äquivalente“ umfassen somit die durch eine oder mehrere Aminosäure-Additionen, -Substitutionen, -Deletionen und/oder -Inversionen erhaltlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungsgemäßen Eigenschaftsprofil füh-
15 ren. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmuster zwischen Mutante und unverändertem Polypeptid qualitativ übereinstimmen, d.h. beispielsweise gleiche Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

Weitere Beispiele für geeignete Aminosäuresubstitutionen sind folgender Tabelle zu entnehmen:

Ursprünglicher Rest	Beispiele der Substitution
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn ; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg ; Gln ; Glu
Met	Leu ; Ile
Phe	Met ; Leu ; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp ; Phe
Val	Ile; Leu

- 5 „Funktionale Äquivalente“ im obigen Sinne sind auch „Präkursoren“ der beschriebenen Polypeptide sowie „funktionale Derivate“ und „Salze“ der Polypeptide.

„Präkursoren“ sind dabei natürliche oder synthetische Vorstufen der Polypeptide mit oder ohne der gewünschten biologischen Aktivität.

10

Unter dem Ausdruck „Salze“ versteht man sowohl Salze von Carboxylgruppen als auch Säureadditionssalze von Aminogruppen der erfindungsgemäßen Proteinmoleküle. Salze von Carboxylgruppen können in an sich bekannter Weise hergestellt werden und umfassen anorganische Salze, wie zum Beispiel Natrium-, Calcium-, Ammonium-, Eisen- und Zinksalze, sowie Salze mit organischen Basen, wie zum Beispiel Aminen, wie Triethanolamin, Arginin, Lysin, Piperidin und dergleichen. Säureadditionssalze, wie zum Beispiel Salze mit Mineralsäuren, wie Salzsäure oder Schwefelsäure und Salze mit organischen Säuren, wie Essigsäure und Oxalsäure sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

20

„Funktionale Derivate“ erfindungsgemäßer Polypeptide können an funktionellen Aminosäure-Seitengruppen oder an deren N- oder C-terminalen Ende mit Hilfe bekannter Techniken ebenfalls hergestellt werden. Derartige Derivate umfassen beispielsweise aliphatische Ester von Carbonsäuregruppen, Amide von Carbonsäuregruppen, erhältlich durch Umsetzung mit Ammoniak oder mit einem primären oder sekundären Amin; N-Acylderivate freier Aminogruppen, her-

gestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen; oder O-Acylderivate freier Hydroxygruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen.

5 Im Falle einer möglichen Proteinglykosylierung umfassen erfindungsgemäße „funktionale Äquivalente“ Proteine des oben bezeichneten Typs in deglykosylierter bzw. glykosylierter Form sowie durch Veränderung des Glykosylierungsmusters erhältliche abgewandelte Formen.

10 „Funktionale Äquivalente“ umfassen natürlich auch Polypeptide welche aus anderen Organismen zugänglich sind, sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

15 „Funktionale Äquivalente“ umfassen ebenfalls Fragmente, vorzugsweise einzelne Domänen oder Sequenzmotive, der erfindungsgemäßen Polypeptide, welche z.B. die gewünschte biologische Funktion aufweisen.

20 „Funktionale Äquivalente“ sind außerdem Fusionsproteine, welche eine der oben genannten Polypeptidsequenzen oder davon abgeleitete funktionale Äquivalente und wenigstens eine weitere, davon funktionell verschiedene, heterologe Sequenz in funktioneller N- oder C-terminaler Verknüpfung (d.h. ohne gegenseitigen wesentliche funktionelle Beeinträchtigung der Fusionsproteinteile) aufweisen. Nichtlimitierende Beispiele für derartige heterologe Sequenzen sind z.B. Signalpeptide oder Enzyme.

25 Erfindungsgemäß mit umfasste „funktionale Äquivalente“ sind Homologe zu den konkret offenbarten Proteinen. Diese besitzen wenigstens 75% ins besondere wenigsten 85 %, wie z.B. 90%, 95%, 97% oder 99%, Homologie zu einer der konkret offenbarten Aminosäuresequenzen, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448. Eine prozentuale Homologie eines erfindungsgemäßen homologen Polypeptids bedeutet insbesondere prozentuale Identität der Aminosäurereste bezogen auf die Gesamtlänge einer der hierin konkret beschriebenen Aminosäuresequenzen.

30

Homologe der erfindungsgemäßen Proteine oder Polypeptide können durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch Punktmutation oder Verkürzung des Proteins.

35 Homologe des erfindungsgemäßen Proteine können durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, wie z.B. Verkürzungsmutanten, identifiziert werden. Beispielsweise kann eine variierte Bank von Protein-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt werden, wie z.B. durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer

Oligonukleotide. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller Homologer aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen in einem Gemisch, die den gewünschten Satz an potentiellen Proteinsequenzen kodieren. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind dem Fachmann bekannt (z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

Im Stand der Technik sind mehrere Techniken zum Screening von Genprodukten kombinatorischer Banken, die durch Punktmutationen oder Verkürzung hergestellt worden sind, und zum Screening von cDNA-Banken auf Genprodukte mit einer ausgewählten Eigenschaft bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Screening der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese erfindungsgemäßer Homologer erzeugt worden sind. Die am häufigsten verwendeten Techniken zum Screening großer Genbanken, die einer Analyse mit hohem Durchsatz unterliegen, umfassen das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren der geeigneten Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen kodiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert. Recursive-Ensemble-Mutagenese (REM), eine Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken vergrößert, kann in Kombination mit den Screeningtests verwendet werden, um Homologe zu identifizieren (Arkin und Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

Weitere Ausgestaltung erfindungsgemäßer kodierender Nukleinsäuresequenzen

Gegenstand der Erfindung sind Verwendung von Nukleinsäuresequenzen (einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen, wie z.B. cDNA und mRNA), die für ein Enzym mit erfindungsgemäßer Dehydrogenase-Aktivität kodieren. Bevorzugt sind Nukleinsäuresequenzen, welche z.B. für Aminosäuresequenzen gemäß Seq ID 2 bzw. Seq ID 4 oder charakteristische Teilsequenzen davon kodieren, oder Nukleinsäuresequenzen gemäß Seq ID 1 bzw. Seq ID 3 oder charakteristische Teilsequenzen davon umfassen.

Alle hierin erwähnten Nukleinsäuresequenzen sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen, wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar.

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seiten 896–897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen (einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen, wie z.B. cDNA und mRNA), kodierend für eines der obigen Polypeptide und deren funktionalen Äquivalenten, welche z.B. unter Verwendung künstlicher Nukleotidanaloga zugänglich sind.

Die Erfindung betrifft sowohl isolierte Nukleinsäuremoleküle, welche für erfindungsgemäße Polypeptide bzw. Proteine oder biologisch aktive Abschnitte davon kodieren, als auch Nukleinsäurefragmente, die z.B. zur Verwendung als Hybridisierungs sonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifikation von erfindungsgemäßer kodierenden Nukleinsäuren verwendet werden können.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem untranslatierte Sequenzen vom 3'- und/oder 5'-Ende des kodierenden Genbereichs enthalten

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

Die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Organismen verwendbar sind. Solche Sonden bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter „stringenten“ Bedingungen (siehe unten) an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B. etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges hybridisiert.

Ein „isoliertes“ Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kann mittels molekularbiologischer Standard-Techniken und der erfindungsgemäß bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Beispielsweise kann cDNA aus einer geeigneten cDNA-Bank isoliert werden, indem eine der konkret offenbarten vollständigen Sequenzen oder ein Abschnitt davon als Hybridisierungssonde und Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine der offenbarten Sequenzen oder ein Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei die Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz erstellt wurden, verwendet werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können ferner durch Standard-Syntheseverfahren, z.B. mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen lassen sich prinzipiell aus allen Organismen identifizieren und isolieren. Vorteilhaft lassen sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder die Homologen davon, aus Pilzen, Hefen, Archeen oder Bakterien isolieren. Als Bakterien seien gram-negative und gram-positive Bakterien genannt. Bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren aus gram-negativen Bakterien vorteilhaft aus α -Proteobakterien, β -Proteobakterien oder γ -Proteobakterien, besonders bevorzugt aus Bakterien der Ordnungen der *Burkholderiales*, *Hydrogenophilales*, *Methylophilales*, *Neisseriales*, *Nitrosomonadales*, *Procabacteriales* oder *Rhodocyclales*. Ganz besonders bevorzugt aus Bakterien der Familie der *Rhodocyclaceae*. Insbesondere bevorzugt aus den Gattung *Azoarcus*. Insbesondere bevorzugt aus Arten *Azoarcus anaerobius*, *Azoarcus buckelii*, *Azoarcus communis*, *Azoarcus evansii*, *Azoarcus indigens*, *Azoarcus toluclasticus*, *Azoarcus tolulyticus*, *Azoarcus toluvorans*, *Azoarcus* sp., *Azoarcus* sp. 22Lin, *Azoarcus* sp. BH72, *Azoarcus* sp. CC-11, *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CR23, *Azoarcus* sp. EB1, *Azoarcus* sp. EbN1, *Azoarcus* sp. FL05, *Azoarcus* sp. HA, *Azoarcus* sp. HxN1, *Azoarcus* sp. mXyN1, *Azoarcus* sp. PbN1, *Azoarcus* sp. PH002, *Azoarcus* sp. T und *Azoarcus* sp. ToN1.

Besonders bevorzugt verwendet man Dehydrogenasen aus *Azoarcus* sp EbN1.

Erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen lassen sich beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Organismen, z.B. über genomische oder cDNA-Banken, isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den erfindungsgemäßen Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide der konservierten Bereiche beispielsweise aus dem aktiven Zentrum, die über Vergleiche mit einer erfindungsgemäßen Dehydrogenase in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden

können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure (Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz) oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, 5 variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca 10 °C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58 °C in einer wässrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC 10 (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid wie beispielsweise 42 °C in 5 x SSC, 50% Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20 °C bis 45 °C, bevorzugt zwischen etwa 30 °C bis 45 °C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen 15 zwischen etwa 30 °C bis 55 °C, bevorzugt zwischen etwa 45 °C bis 55 °C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik, wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular 20 Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Proto- 25 cols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Gegenstand der Erfindung sind auch Derivate der konkret offenbarten oder ableitbaren Nukleinsäuresequenzen. 30

So können weitere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen von Seq ID 1 bzw. Seq ID 3 abgeleitet sein und sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide unterscheiden, aber weiterhin für Polypeptide mit dem gewünschten 35 Eigenschaftsprofil kodieren.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder

Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten oder Allelvarianten, davon.

5 Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

10 Gegenstand der Erfindung sind auch die durch Sequenzpolymorphismen von den konkret offenbarten Nukleinsäuren abgeleiteten Moleküle. Diese genetischen Polymorphismen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund der natürlichen Variation existieren. Diese natürlichen Variationen bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz eines Gens.

15 Unter Derivaten einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz sind beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 40 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 60 % Homologie, ganz besonders bevorzugt mindestens 80, 85, 90, 93, 95 oder 98 % Homologie über den gesamten Sequenzbereich aufweisen (bezüglich Homologie auf Aminosäureebene sei auf obige Ausführungen zu den Polypeptiden verwiesen auf). Über Teilbereiche der Sequenzen können die Homologien vorteilhaft höher liegen.

20 Weiterhin sind unter Derivaten auch Homologe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen beispielsweise pilzliche oder bakterielle Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der kodierenden und nichtkodierenden DNA-Sequenz, zu verstehen. So besitzen z.B. auf DNA-Ebene eine Homologie von mindestens 40 %, bevorzugt von mindestens 60
25 %, besonders bevorzugt von mindestens 70 %, ganz besonders bevorzugt von mindestens 80 % über den gesamten angegebenen DNA-Bereich.

Außerdem sind unter Derivaten beispielsweise Fusionen mit Promotoren zu verstehen. Die Promotoren, die den angegebenen Nukleotidsequenzen vorgeschaltet sind, können durch ein
30 oder mehrere Nukleotidaustausche, Insertionen, Inversionen und/oder Deletionen verändert sein, ohne dass aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des Weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

35 Unter Derivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich von -1 bis -1000 Basen stromaufwärts vor dem Startkodon oder 0 bis 1000 Basen stromabwärts nach

dem Stoppkodon so verändert wurden, dass die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird.

Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten
5 kodierenden Sequenzen unter „stringenten Bedingungen“ hybridisieren. Diese Polynukleotide lassen sich bei der Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Banken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch auf chemischem Wege synthetisiert werden. Unter dieser Eigenschaft versteht man
10 die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu 70-100%, vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze.
15 Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-Technik die Verwendung einer 50 – 70°C, vorzugsweise 60 – 65°C warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1x SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur
20 in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander gebunden. Die Einstellung stringenter Bedingungen ist dem Fachmann bekannt und ist z.B. in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

25 Ausgestaltungen erfindungsgemäßer Konstrukte

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Polypeptid
30 kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie
35 gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz.

Unter einer „operativen Verknüpfung“ versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart,

dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Unter einem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt sind insbesondere solche zu verstehen, bei welchen das Gen für eine erfindungsgemäße Dehydrogenase mit einem oder mehreren Regulationssignalen zur Steuerung, z.B. Erhöhung, der Genexpression operativ oder funktionell verknüpft wurden.

Zusätzlich zu diesen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Nukleinsäurekonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die kodierende Sequenz inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird.

Ein bevorzugtes Nukleinsäurekonstrukt enthält vorteilhafterweise auch eine oder mehrere der schon erwähnten "Enhancer" Sequenzen, funktionell verknüpft mit dem Promotor, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können in einer oder mehreren Kopien im Konstrukt enthalten sein. Im Konstrukt können noch weitere Marker, wie Antibiotikaresistenzen oder Auxotrophien komplementierende Gene, gegebenenfalls zur Selektion auf das Konstrukt enthalten sein.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacI^q*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *rhaP* (*rhaP_{BAD}*)*SP6-*, *lambda-P_R-* oder im *lambda-P_L-*Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*, in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MFalpha*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* enthalten. In diesem Zusammenhang sind auch die Promotoren der Pyruvatdecarboxylase und der Methanoloxida-

se, beispielsweise aus *Hansenula* vorteilhaft. Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

Das Nukleinsäurekonstrukt wird zur Expression in einem Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen Vektor, wie beispielsweise einem Plasmid oder einem Phagen inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Unter Vektoren sind außer Plasmiden und Phagen auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, also z.B. Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden. Diese Vektoren stellen eine weitere Ausgestaltung der Erfindung dar. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pKK223-3, pDHE19.2, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, Igt11 oder pBdCl, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2alphaM, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLye23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004 oder pDH51. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

Vorteilhafterweise enthält das Nukleinsäurekonstrukt zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3'- und/oder 5'-terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtsorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann der das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt oder die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthaltende Vektor auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Vektor wie einem Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt oder der erfindungsgemäßen Nukleinsäure bestehen.

Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen ist es vorteilhaft die Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern. Der "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten kodierenden Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden.

Erfindungsgemäß brauchbare Wirtsorganismen

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren oder Konstrukte sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der erfindungsgemäßen Polypeptide eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Mo-

lecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, oder Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

5 Erfindungsgemäß sind auch homolog rekombinierte Mikroorganismen herstellbar. Dazu wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines erfindungsgemäßen Gens oder einer kodierenden Sequenz enthält, worin gegebenenfalls wenigstens eine Aminosäure-Deletion, -
Addition oder -Substitution eingebracht worden ist, um die erfindungsgemäße Sequenz zu ver-
ändern, z.B. funktionell zu disruptieren ("Knockout"-Vektor). Die eingebrachte Sequenz kann
10 z.B. auch ein Homologes aus einem verwandten Mikroorganismus sein oder aus einer Säuge-
tier-, Hefe- oder Insektenquelle abgeleitet sein. Der zur homologen Rekombination verwendete
Vektor kann alternativ derart ausgestaltet sein, daß das endogene Gen bei homologer Rekombi-
nation mutiert oder anderweitig verändert ist, jedoch noch das funktionelle Protein kodiert
(z.B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich derart verändert sein, dass da-
15 durch die Expression des endogenen Proteins verändert wird). Der veränderte Abschnitt des
erfindungsgemäßen Gens ist im homologen Rekombinationsvektor. Die Konstruktion geeigneter
Vektoren zur homologen Rekombination ist z.B. beschrieben in Thomas, K.R. und Capecchi,
M.R. (1987) Cell 51:503.

20 Als rekombinante Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder dem Nuklein-
säurekonstrukt kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen in
Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze
oder Hefen verwendet. Vorteilhaft werden gram-positive oder gram-negative Bakterien, bevor-
zugt Bakterien der Familien *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhizobiaceae*, *Strepto-*
25 *mycetaceae* oder *Nocardiaceae*, besonders bevorzugt Bakterien der Gattungen *Escherichia*,
Pseudomonas, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Burkholderia*, *Salmonella*, *Agrobacterium* oder *Rhodo-*
coccus verwendet. Ganz besonders bevorzugt ist die Gattung und Art *Escherichia coli*. Weitere
vorteilhafte Bakterien sind darüber hinaus in der Gruppe der α -Proteobakterien, β -
Proteobakterien oder γ -Proteobakterien zu finden.

30 Der Wirtsorganismus oder die Wirtsorganismen gemäß der Erfindung enthalten dabei vorzugs-
weise mindestens eine der in dieser Erfindung beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, Nuk-
leinsäurekonstrukte oder Vektoren, die für ein Enzym mit erfindungsgemäßer Dehydrogena-
seaktivität kodieren.

35 Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganism-
mus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden
in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern,

eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0 °C und 100 °C, bevorzugt zwischen 10 °C bis 60 °C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährlüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann „batch“-weise, „semi batch“-weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nachgefüttert werden. Das Keton kann direkt zur Anzucht gegeben werden oder vorteilhaft nach Anzucht. Die Enzyme können nach dem in den Beispielen beschriebenen Verfahren aus den Organismen isoliert werden oder als Rohextrakt für die Reaktion verwendet werden.

Rekombinante Herstellung erfindungsgemäßer Polypeptide

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung erfindungsgemäße Polypeptide oder funktioneller, biologisch aktiver Fragmente davon, wobei man einen Polypeptide-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Polypeptide induziert und diese aus der Kultur isoliert. Die Polypeptide können so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

Der rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

Die Zellen werden dann, falls die Polypeptide nicht in das Kulturmedium sezerniert werden, aufgeschlossen und das Produkt nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z.B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

Eine Aufreinigung der Polypeptide kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

Vorteilhaft kann es sein, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die z.B. einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z.B. einer Poly-

mermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

5 Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

10 Weitere Ausgestaltungen zur Durchführung des erfindungsgemäßen enzymatischen Reduktionsverfahrens

Die Dehydrogenasen können im erfindungsgemäßen Verfahren als freies oder immobilisiertes Enzym oder als noch im rekombinanten Produktionsorganismus enthaltenen Katalysator verwendet werden.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorteilhaft bei einer Temperatur zwischen 0 °C bis 95 °C, bevorzugt zwischen 10 °C bis 85 °C, besonders bevorzugt zwischen 15 °C bis 75 °C durchgeführt.

Der pH-Wert im erfindungsgemäßen Verfahren wird vorteilhaft zwischen pH 4 und 12, bevorzugt zwischen pH 4,5 und 9, besonders bevorzugt zwischen pH 5 und 8 gehalten.

25 Unter enantiomerenreinen bzw. chiralen Produkten sind im erfindungsgemäßen Verfahren Enantiomere zu verstehen, die eine Enantiomerenanreicherung zeigen. Bevorzugt werden im Verfahren Enantiomerenreinheiten von mindestens 70 %ee, bevorzugt von min. 80 %ee, besonders bevorzugt von min. 90 %ee, ganz besonders bevorzugt min. 98 %ee erreicht.

30 Für das erfindungsgemäße Verfahren können wachsende Zellen verwendet werden, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte oder Vektoren enthalten. Auch ruhende oder aufgeschlossene Zellen können verwendet werden. Unter aufgeschlossenen Zellen sind beispielsweise Zellen zu verstehen, die über eine Behandlung mit beispielsweise Lösungsmitteln durchlässig gemacht worden sind, oder Zellen die über eine Enzymbehandlung, über eine mechanische Behandlung (z.B. French Press oder Ultraschall) oder über eine sonstige Methode aufgebrochen wurden. Die so erhaltenen Rohextrakte sind für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft geeignet. Auch gereinigte oder angereinigte Enzyme können für das Verfahren verwendet werden. Ebenfalls geeignet sind immobilisierte Mikroorganismen oder Enzyme, die vorteilhaft in der Reaktion Anwendung finden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann batchweise, semi-batchweise oder kontinuierlich betrieben werden.

- 5 Die Durchführung des Verfahrens kann vorteilhafterweise in Bioreaktoren erfolgen, wie z.B. beschrieben in *Biotechnology*, Band 3, 2. Auflage, Rehm et al Hrsg., (1993) insbesondere Kapitel II.

10 Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung veranschaulichen, ohne sie jedoch einzuschränken.

Experimenteller Teil

Beispiel 1: Klonierung der Alkohol-Dehydrogenase EbN2 aus *Azoarcus* sp. EbN1.

15 Die Sequenz des Dehydrogenasegens EbN2 aus *Azoarcus* sp. EbN1 ist in Datenbanken hinterlegt (SEQ ID NO:1, [Genbank ID 56475432, Region: 2797788..2798528]). Von der Nukleinsäuresequenz des Gens wurden Oligonukleotide abgeleitet, mit denen nach bekannten Verfahren das Gen aus genomischer DNA von *Azoarcus* sp. EbN1 amplifiziert wurde. Die erhaltene Sequenz entspricht der publizierten Sequenz.

PCR-Bedingungen:

20	2 µL	10*Pfu-Ultra Puffer (Stratagene)
	100 ng	Primer #1
	100 ng	Primer #2
	1 µL	dNTP (je 10 mM)
	ca. 30 ng	chromosomale DNA aus <i>Azoarcus</i> sp. EbN1
25	1 U	<i>Pfu</i> -Ultra DNA Polymerase
	ad 20 µL	H ₂ O

Temperaturprogramm:

30	5 min, 94°C,	} (35 Zyklen)
	60 sec, 50°C,	
	2 min, 72°C,	
	60 sec, 94°C,	
	10 min, 72°C,	
35	abkühlen auf 10°C	

Das PCR-Produkt (ca. 751 bp) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* verdaut und in entsprechend verdauten pDHE19.2-Vektor (DE19848129) kloniert. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* XL1 Blue (Stratagene) transformiert.

- 5 Das erhaltene Plasmid *pDHE-PDH-L* wurde in den Stamm *E. coli* TG10 pAgro4 pHSG575 transformiert (TG10: ein *RhaA*-Derivat von *E. coli* TG1(Stratagene); pAgro4: Takeshita, S; Sato, M; Toba, M; Masahashi, W; Hashimoto-Gotoh, T (1987) *Gene* 61, 63-74; pHSG575: T. Tomoyasu et al (2001), *Mol. Microbiol.* 40(2), 397-413).
- 10 Die rekombinanten *E. coli* werden mit LU 13151 bezeichnet.

Beispiel 2: Klonierung der Alkohol-Dehydrogenase *ChnA* aus *Azoarcus* sp. EbN1.

Die Sequenz des Dehydrogenasegens *ChnA* aus *Azoarcus* sp. EbN1 ist in Datenbanken hinterlegt ([Genbank ID 56475432, Region: (complement) 192247..192993]). Von der Nukleinsäuresequenz des Gens wurden Oligonukleotide abgeleitet, mit denen nach bekannten Verfahren das Gen aus genomischer DNA von *Azoarcus* sp. EbN1 amplifiziert wurde. Die erhaltene Sequenz entspricht der publizierten Sequenz.

- PCR-Bedingungen:
- | | | |
|----|-----------|---|
| 20 | 2 µL | 10*Pfu-Ultra Puffer (Stratagene) |
| | 100 ng | Primer #3 |
| | 100 ng | Primer #4 |
| | 1 µL | dNTP (je 10 mM) |
| | ca. 30 ng | chromosomale DNA aus <i>Azoarcus</i> sp. EbN1 |
| 25 | 1 U | <i>Pfu</i> -Ultra DNA Polymerase |
| | ad 20 µL | H ₂ O |

- Temperaturprogramm:
- | | | |
|----|-------------------|---------------|
| 30 | 5 min, 94°C, | } (35 Zyklen) |
| | 60 sec, 50°C, | |
| | 2 min, 72°C, | |
| | 60 sec, 94°C, | |
| | 10 min, 72°C, | |
| 35 | abkühlen auf 10°C | |

Das PCR-Produkt (ca. 743bp) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BglII* verdaut und in einen *NdeI* und *BamHI* restringierten pDHE19.2-Vektor (DE19848129) kloniert. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* XL1 Blue (Stratagene) transformiert.

- 40 Das erhaltene Plasmid *pDHE-PDH-L* wurde in den Stamm *E. coli* TG10 pAgro4 pHSG575 transformiert (TG10: ein *RhaA*-Derivat von *E. coli* TG1(Stratagene); pAgro4: Takeshita, S; Sato, M;

Toba, M; Masahashi, W; Hashimoto-Gotoh, T (1987) Gene 61, 63-74; pHSG575: T. Tomoyasu et al (2001), Mol. Microbiol. 40(2), 397-413).

Die rekombinanten *E. coli* werden mit LU 13283 bezeichnet.

5 Beispiel 3: Bereitstellung rekombinanter 'anti-Prelog'-Dehydrogenasen

LU 13151 oder LU 13283 wurden in 20mL LB-Amp/Spec/Cm (100µg/l Ampicillin; 100µg/l Spectinomycin; 20µg/l Chloramphenicol), 0,1mM IPTG, 0,5g/L Rhamnose in 100mL Erlenmeyerkolben (Schikanen) 18 h bei 37°C angezogen (alternativ kann man auch zuerst eine Vorkultur machen mit gleichen Antibiotikakonz., aber ohne IPTG und Rhamnose. Diese wird 5 h bei 37°C

10 inkubiert und dann mit 1% in die Hauptkultur beimpft), bei 5000*g/10min zentrifugiert, einmal mit 10mM TRIS*HCl, pH7,0 gewaschen und in 2 mL des gleichen Puffers resuspendiert.

Zellfreier Proteinrohextrakt wurde hergestellt indem Zellpaste von LU 13151 bzw. LU 13283 0,7ml Glaskugeln (d=0,5mm) in einer Schwingmühle (3x 5min mit Zwischenkühlung auf Eis) aufgeschlossen wurde.

15

Beispiel 4: Aktivitätsbestimmung der rekombinanten 'anti-Prelog'-Dehydrogenasen aus *Azoarcus* sp. EbN1

Je 6 Transformanten wurden in 20mL LB Amp/Spec/Cm (100µg/l Amp; 100mg/l Spec; 20µg/l Cm) 0,1mM IPTG 0,5g/L Rhamnose in 100mL Erlenmeyerkolben (Schikanen) 18 h bei 37°C

20 angezogen, bei 5000*g/10min zentrifugiert, einmal mit 10mM Tris/HCl pH7,0 gewaschen und in 2 mL des gleichen Puffers resuspendiert.

Zellfreier Rohextrakt der rekombinanten *E.coli*, die die Dehydrogenasegene enthalten wurde durch Zellaufschluss mit 0,7ml Glaskugeln (d=0,5mm) in einer Schwingmühle (3x 5min mit Zwischenkühlung auf Eis) gewonnen.

25

Im Photometer kann bei 340 nm der Verbrauch reduzierter Kosubstrate während der Reduktion von Ketonen verfolgt werden. In 1 mL 50 mM KP_i , 1 mM $MgCl_2$, pH 6.5 wurden bei 30° C 10 µL verdünnter zellfreier Rohextrakt (\cong 10 µg Protein), 10 µmol Keton und 250 nmol NADH oder NADPH inkubiert. 1 Unit (1U) entspricht der Enzymmenge, die in 1 min 1µmol Keton reduziert.

30

Beispiel 5: Herstellung von (S)-1-Pyridin-4-yl-ethanol im 4L-Labormaßstab

Es wurde eine Batchfahrweise statt einer Dosierung für das Pyridin-4-yl-ethanon getestet, da es die Handhabung im Technikum vereinfacht. Des Weiteren wurde 2-Butanol als Lösungsmittel statt *iso*-Propanol getestet. In einem weiteren Versuch wurde die Menge an *iso*-Propanol von 40% auf 20% reduziert, um die anschließende Destillationszeit zu verkürzen.

35

Dazu wurden in einem beheizbaren 4-l-Reaktor mit Rührer 0,8 l *iso*-Propanol bzw. 2 l 2-Butanol in einem 33 mM KH₂PO₄-Puffer (pH 6,5) ohne Zusatz von MgCl₂ bzw. MgSO₄ (dies kann zu einer Vergiftung des Katalysators bei der späteren Kernhydrierung führen) vorgelegt. 0,5 g (0,2 mM) NAD und 483 g (1M) Pyridin-4-yl-ethanon wurden zugegeben. Durch Zugabe von 100 ml des Biokatalysators LU11558 in Form von ganzen Zellen (unbehandelter Fermenteraustrag) wurde die Reaktion gestartet. Das einphasige Reaktionsgemisch wurde bei 40°C. Der pH-Wert blieb konstant auf pH~6,5. Jede Stunde wurde eine Probe gezogen, mit konz. HCl abgestoppt und mittels HPLC (GV31366/132) analysiert. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 4 l.

10 Nach ca. 24 h wurde die Reaktionsmischung abgelassen und zur Aufarbeitung gegeben.

Die Batchfahrweise mit 50% 2-Butanol (v/v) zeigt nach 5 Stunden einen nahezu vollständigen Umsatz. Es sind noch ca. 1,6% Keton übrig, welche sich über Nacht auf 1,4% reduzieren.

15 Ein Problem bei dieser Fahrweise stellt jedoch die spätere Aufarbeitung dar: Man erhält nicht wie erwartet ein zweiphasiges Gemisch, sondern nur eine Phase. Dies liegt vermutlich an den großen Mengen von Pyridin-4-yl-ethanon, die lösungsvermittelnd wirken können. Selbst bei Zugabe von Wasser bzw. 2-Butanol zum Austrag kommt es zu keiner Phasentrennung, so dass hier eine Destillation erfolgen muss.

20 Die Batchfahrweise mit 20% *iso*-Propanol zeigt einen deutlich langsameren Verlauf der Reduktion im Vergleich zu 2-Butanol. Nach ca. 24 h erhält man einen nahezu vollständigen Umsatz mit noch ca. 1,9% verbleibendem Keton.

Für die Aufarbeitung bringt jedoch der Einsatz von *iso*-Propanol statt 2-Butanol Vorteile, da man *iso*-Propanol leichter abdestillieren kann. Durch die Verringerung des Volumens an *iso*-Propanol wird außerdem die Destillationszeit verkürzt.

Aufarbeitung:

Die Reduktionsausträge werden zunächst jeweils über Celite® filtriert.

30 Bei der Verwendung von 50% 2-Butanol als Hilfsalkohol erhält man ein einphasiges Reaktionsgemisch, welches beim Einengen am Rotationsverdampfer keine klare, rasche Phasentrennung ergibt. Durch Zugabe von 10 Gew.% NaCl erhält man eine gute, schnelle Phasentrennung mit einer Mulmschicht, die sich an der Trennzone konzentriert. Einengen der organischen Phase am Rotationsverdampfer liefert das gewünschte Produkt in 82% Ausbeute. Der Chlorgehalt beträgt 0,1% und erweist sich bei der anschließenden Hydrierung vermutlich als Katalysatorgift. Daher wurde auch bei der enzymatischen Reduktion auf Zusatz jeglicher Chlorid-haltiger Salze (z.B. MgCl₂) verzichtet (s. 2.2). Gegenextraktion der organischen Phasen mit Wasser führte zu

deutlichem Produktverlust aufgrund der guten Löslichkeit des (S)-1-Pyridin-4-yl-ethanols in Wasser.

Die Fahrweise mit 20% *iso*-Propanol (Raschig-Ware) stellte sich für die Technikums-kampagne als Methode der Wahl heraus aufgrund der einfachen Aufarbeitungsweise: nach erfolgter Celite®-Filtration wird das einphasige Gemisch zunächst auf ca. 50% (w/w) bei 50 – 60°C am Rotationsverdampfer eingeeengt.

Eine erste Extraktion erfolgt dann mit der doppelten Menge (w/w) Ethylacetat wahlweise bei Raumtemperatur bzw. bei 50°C, um eine schnellere Phasentrennung zu erhalten. In jedem Fall erhält man eine Mulmschicht zwischen wässriger und organischer Phase. Diese kann mit der organischen (a) oder mit der wässrigen Phase (b) separiert werden. Im Fall a ist eine nochmalige Filtration erforderlich. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhält man 78% des gewünschten Produktes als hell-sandfarbenen Feststoff. Nochmalige Extraktion der wässrigen Phase mit 150% (w/w) Ethylacetat und Aufarbeitung nach (a) ergibt weitere 10%, d.h. insgesamt 88% Ausbeute an (S)-1-Pyridin-4-yl-ethanol im 4L-Labormaßstab (ee>99%, chem. Reinheit >98%).

Beispiel 6: Herstellung von (S)-1-Piperidin-4-yl-ethanol

In einem ersten Schritt wurde ein gängiger Kernhydrierungskatalysator für die beabsichtigte Reaktion getestet. Dabei handelte es sich um einen geträgerten Metallkatalysator bestehend aus 5%Ru auf Al₂O₃. Diese Kontakte sind für das Festbett vorgesehen und wurden daher für eine batch-Fahrweise gemahlen.

Umgesetzt wurde eine 26%-Lösung von enantiomerenreinen (S)-1-Pyridin-4-yl-ethanol aus der enzymatischen Reduktion von 4-Acetylpyridin, Beispiel 5) in Methanol bei 130 °C und 200 bar H₂ mit einer Katalysatorenbeladung von 1,5 Gew.-% bezogen auf das Edukt.

Der getestete Katalysator zeigte einen sehr guten Umsatz mit ebenfalls sehr gute Selektivität, weshalb er in den folgenden Optimierungsarbeiten verwendet wurde.

Der Umsatz lag bei >99%, die Selektivität bei 93%. Der ee-Wert betrug 96%

Weitere optische Anreicherung

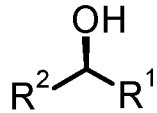
Eine weitere Möglichkeit der Erhöhung des ee-Wertes liegt in der Fällung der Rohware mit (R)-Mandelsäure.

Dazu wurde der Alkohol in Isopropanol mit einer äquimolaren Menge an (*R*)-Mandelsäure versetzt und zum Rückfluss erhitzt. Beim langsamen Abkühlen bildeten sich ab 73 °C vereinzelt Kristalle. Mit einer Rampe von -5 °C/h wurde die Temperatur auf 20 °C reduziert und das
5 Kristallisat abfiltriert. Dabei lag die Feststoffbeladung bei ca. 11% und der Filtrationswiderstand bei $1,36 \cdot 10^{12}$ mPas/m².

Aus dem Mandelsäuresalz wurde der gewünschte Alkohol freigesetzt. Der ee-Wert konnte bei einer Gesamtausbeute von 76% auf 99,2% gesteigert werden. Die chemische Reinheit lag bei
10 >99,5%.

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Herstellung von N-heterozyklischen optisch aktiven Alkoholen der Formel I



Formel I

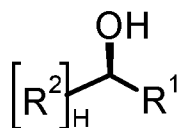
worin

10 R^1 für Alkylgruppen stehen, die wiederum ein- oder mehrfach substituiert sein können, durch Alkyl, Halogen, SH, SR^3 , OH, OR^3 , NO_2 , CN, CO, COOR^3 , NR^3R^4 oder $\text{NR}^3\text{R}^3\text{R}^5\text{X}^-$, wobei R^3 , R^4 und R^5 unabhängig voneinander für H oder einen Niedrigalkyl- oder Niedrigalkoxy-Rest stehen und X^- für ein Gegenion steht

15 R^2 für N-haltige Heteroarylgruppen stehen, die wiederum ein- oder mehrfach substituiert sein können, durch Alkyl, Halogen, SH, SR^3 , OH, OR^3 , NO_2 , CN, CO, COOR^3 , NR^3R^4 oder $\text{NR}^3\text{R}^3\text{R}^5\text{X}^-$, wobei R^3 , R^4 und R^5 unabhängig voneinander für H oder einen Niedrigalkyl- oder Niedrigalkoxy-Rest stehen und X^- für ein Gegenion steht

20 durch Reduktion des entsprechenden Ketons, wobei die Reduktion mit einer Dehydrogenase mit der Polypeptidsequenz SEQ ID NO:2 oder NO:4, oder mit einer Polypeptidsequenz, bei der bis zu 25% der Aminosäurereste gegenüber SEQ ID NO:2 oder NO:4 durch Deletion; Insertion, Substitution oder einer Kombination davon verändert sind, durchgeführt wird.

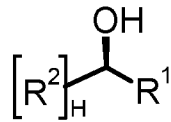
- 25 2. Verwendung eines Verfahrens nach Anspruch 1 in einer Reaktion zur Herstellung von N-heterozyklischen optisch aktiven Alkoholen der Formel III,



Formel III

wobei der gemäß Anspruch 1 erhaltene Alkohol der Formel I durch Hydrierung des N-haltigen Heteroarylrestes R^2 weiter umgesetzt wird.

3. Verfahren zur Herstellung von N-heterozyklischen optisch aktiven Alkoholen der Formel III,



Formel III

- 5
indem man in einem ersten Schritt (a) das Verfahren gemäß Anspruch 1 durchführt und in einem zweiten Schritt (b) den in (a) erhaltenen optisch aktiven Alkohol der Formel I durch Hydrierung in III überführt.
- 10 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydrierung in Schritt (b) mit einem Ruthenium-Katalysator auf Al_2O_3 durchgeführt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R^2 4-Pyridinyl und R^1 Methyl ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/070607

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12P7/22 C12N9/04
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P C12N
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/155302 A1 (BASF SE [DE]; UNIV ALBERT LUDWIGS FREIBURG [DE]; MAX PLANCK INST FUER) 24 December 2008 (2008-12-24) the whole document	1-5
Y	WO 2005/108590 A2 (BASF AG [DE]; STUERMER RAINER [DE]; KESSELER MARIA [DE]; HAUER BERNHAR) 17 November 2005 (2005-11-17) page 10 - page 11	1-5
A	DE 10 2006 056526 A1 (ARCHIMICA GMBH [DE]) 5 June 2008 (2008-06-05) the whole document	1-5
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search 8 February 2012	Date of mailing of the international search report 17/02/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Schneider, Patrick

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/070607

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MATSUDA T ET AL: "Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction", TETRAHEDRON ASYMMETRY, PERGAMON PRESS LTD, OXFORD, GB, vol. 20, no. 5, 25 March 2009 (2009-03-25) , pages 513-557, XP026088241, ISSN: 0957-4166, DOI: 10.1016/J.TETASY.2008.12.035 [retrieved on 2009-04-15] the whole document -----</p>	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/070607

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008155302 A1	24-12-2008	AT 535608 T	15-12-2011
		CA 2691799 A1	24-12-2008
		CN 101796192 A	04-08-2010
		EP 2171074 A1	07-04-2010
		JP 2010530230 A	09-09-2010
		US 2010143991 A1	10-06-2010
		WO 2008155302 A1	24-12-2008

WO 2005108590 A2	17-11-2005	CN 1950513 A	18-04-2007
		DE 102004022686 A1	24-11-2005
		EP 1745133 A2	24-01-2007
		ES 2328264 T3	11-11-2009
		JP 4782109 B2	28-09-2011
		JP 2007535956 A	13-12-2007
		US 2008206824 A1	28-08-2008
		WO 2005108590 A2	17-11-2005

DE 102006056526 A1	05-06-2008	DE 102006056526 A1	05-06-2008
		EP 2086952 A2	12-08-2009
		WO 2008064817 A2	05-06-2008

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. C12P7/22 C12N9/04
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 C12P C12N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 2008/155302 A1 (BASF SE [DE]; UNIV ALBERT LUDWIGS FREIBURG [DE]; MAX PLANCK INST FUER) 24. Dezember 2008 (2008-12-24) das ganze Dokument	1-5
Y	WO 2005/108590 A2 (BASF AG [DE]; STUERMER RAINER [DE]; KESSELER MARIA [DE]; HAUER BERNHAR) 17. November 2005 (2005-11-17) Seite 10 - Seite 11	1-5
A	DE 10 2006 056526 A1 (ARCHIMICA GMBH [DE]) 5. Juni 2008 (2008-06-05) das ganze Dokument	1-5
	-/--	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Februar 2012

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17/02/2012

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schneider, Patrick

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>MATSUDA T ET AL: "Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction", TETRAHEDRON ASYMMETRY, PERGAMON PRESS LTD, OXFORD, GB, Bd. 20, Nr. 5, 25. März 2009 (2009-03-25), Seiten 513-557, XP026088241, ISSN: 0957-4166, DOI: 10.1016/J.TETASY.2008.12.035 [gefunden am 2009-04-15] das ganze Dokument -----</p>	1-5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/070607

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2008155302 A1	24-12-2008	AT 535608 T	15-12-2011
		CA 2691799 A1	24-12-2008
		CN 101796192 A	04-08-2010
		EP 2171074 A1	07-04-2010
		JP 2010530230 A	09-09-2010
		US 2010143991 A1	10-06-2010
		WO 2008155302 A1	24-12-2008

WO 2005108590 A2	17-11-2005	CN 1950513 A	18-04-2007
		DE 102004022686 A1	24-11-2005
		EP 1745133 A2	24-01-2007
		ES 2328264 T3	11-11-2009
		JP 4782109 B2	28-09-2011
		JP 2007535956 A	13-12-2007
		US 2008206824 A1	28-08-2008
		WO 2005108590 A2	17-11-2005

DE 102006056526 A1	05-06-2008	DE 102006056526 A1	05-06-2008
		EP 2086952 A2	12-08-2009
		WO 2008064817 A2	05-06-2008
