**PCT**

**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM**

**Internationales Ämter**

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

| (51) Internationale Patentklassifikation 5: C12N 15/53, 9/04, C12P 7/42 |
| C12N 15/74, 1/20 // (C12N 1/20 |
| C12R 1/19) (C12N 9/04 |
| C12R 1/19) |
| (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/03560 |
| (33) Internationales Anmeldedatum: 11. September 1990 (11.09.90) |
| (30) Prioritätsdaten: |
| P 39 30 317.9 11. September 1989 (11.09.89) DE |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). |
| (75) Veröffentlichung |
| Mit internationalem Recherchenbericht. |
| (54) Title: L-HicDH-GENE, DNA PARTIAL SEQUENCES OF SAID GENE, EXPRESSION VECTORS WITH THE GENE OR THE PARTIAL SEQUENCES, E. COLI STRAINS FOR THE PRODUCTION OF L-HicDH AS WELL AS PROCESS IN WHICH THIS IS USED |
| (54) Bezeichnung: L-HicDH-GEN, DNA-TEILSEQUENZEN DES GENS, EXPRESSIONSVEKTOREN MIT DEM GEN ODER DEN TEILSEQUENZEN, E-COLI-STÄMME FÜR DIE HERSTELLUNG VON L-HicDH, L-HicDH SOWIE VERFAHREN UNTER DESSEN VERWENDUNG |
| (57) Abstract |

The invention concerns the L-HicDH gene, DNA partial sequences of the L-HicDH gene (in particular for use as translation initiator and/or as transcription terminator for the production of gene products), expression vectors with the L-HicDH gene or the DNA partial sequences, E. coli strains for the production of L-HicDH, the enzyme L-HicDH as well as process in which this is used for the conversion of hydroxyl acids into ketonic acids and vice-versa.

(57) Zusammenfassung


* Siehe Rückseite
BENENNUNGEN VON "DE"

Bis auf weiteres hat jede Benennung von "DE" in einer internationalen Anmeldung, deren internationaler Anmeldetag vor dem 3. Oktober 1990 liegt, Wirkung im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland mit Ausnahme des Gebietes der früheren DDR.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

<table>
<thead>
<tr>
<th>AT</th>
<th>Österreich</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>AU</td>
<td>Australien</td>
</tr>
<tr>
<td>BB</td>
<td>Barbados</td>
</tr>
<tr>
<td>BE</td>
<td>Belgien</td>
</tr>
<tr>
<td>BF</td>
<td>Burkina Faso</td>
</tr>
<tr>
<td>BG</td>
<td>Bulgarien</td>
</tr>
<tr>
<td>BJ</td>
<td>Benin</td>
</tr>
<tr>
<td>BR</td>
<td>Brasilien</td>
</tr>
<tr>
<td>CA</td>
<td>Kanada</td>
</tr>
<tr>
<td>CF</td>
<td>Zentrale Afrikanische Republik</td>
</tr>
<tr>
<td>CG</td>
<td>Kongo</td>
</tr>
<tr>
<td>CH</td>
<td>Schweiz</td>
</tr>
<tr>
<td>CM</td>
<td>Kamerun</td>
</tr>
<tr>
<td>DE</td>
<td>Deutschland</td>
</tr>
<tr>
<td>DK</td>
<td>Dänemark</td>
</tr>
<tr>
<td>BS</td>
<td>Spanien</td>
</tr>
<tr>
<td>FI</td>
<td>Finnland</td>
</tr>
<tr>
<td>FR</td>
<td>Frankreich</td>
</tr>
<tr>
<td>GA</td>
<td>Gabon</td>
</tr>
<tr>
<td>GB</td>
<td>Vereinigtes Königreich</td>
</tr>
<tr>
<td>GR</td>
<td>Griechenland</td>
</tr>
<tr>
<td>HU</td>
<td>Ungarn</td>
</tr>
<tr>
<td>IT</td>
<td>Italien</td>
</tr>
<tr>
<td>JP</td>
<td>Japan</td>
</tr>
<tr>
<td>KR</td>
<td>Republik Korea</td>
</tr>
<tr>
<td>LK</td>
<td>Sri Lanka</td>
</tr>
<tr>
<td>LU</td>
<td>Luxemburg</td>
</tr>
<tr>
<td>MC</td>
<td>Monac</td>
</tr>
</tbody>
</table>

MC  | Madagaskar |
ML  | Mali       |
MR  | Mauritania |
MW  | Malawi     |
NL  | Niederlande |
NO  | Norwegen  |
PL  | Polen      |
RO  | Rumänien  |
SD  | Sudan     |
SE  | Schweden  |
SN  | Senegal   |
SU  | Sowjetunion |
TD  | Tschad     |
TG  | Togo      |
oUS| Vereinigte Staaten von Amerika |
L-HicDH-Gen, DNA-Teilsequenzen des Gens, Expressionsvektoren mit dem Gen oder den Teilsequenzen, E.-coli-Stämme für die Herstellung von L-HicDH, L-HicDH sowie Verfahren unter dessen Verwendung

herzustellen. Um ausreichende Mengen an Enzym für Umsetzungen in industriellen Maßstab zu gewinnen (anfänglich lagen die Ausbeuten nur bei 0,1 mg pro Liter Kulturflüssigkeit = 65 Einheiten (U)), und um einen ersten Schritt in Richtung eines gentechnologischen Ansatzes des Designs von Proteinen zu machen, das auf eine Änderung der Substratspezifitäten zielt, müssen alle Gene für diese Enzyme (L-HicDH, D-HicDH und L-LeuDH) kloniert werden. Es war die Aufgabe dieser Erfindung, das L-HicDH-Gen zu klonieren und zu charakterisieren und es in E. coli zu exprimieren.

Gemäß einer Ausführungsform betrifft die Erfindung das L-HicDH-Gen, nämlich die Positionen 328 bis 1261 oder bis 1264 oder bis 1267 oder bis 1270 oder bis 1273 oder bis 1276 der folgenden DNA-Sequenz:
wobei das Gen an beliebiger Position um 1, 2 oder 3 Basen-
triplets verkürzt oder verlängert sein kann oder wobei ein
Basentriplet des Gens durch ein anderes Basentriplet ersetzt
sein kann oder wobei ein oder mehrere Basentriplets durch ein
dieselbe Aminosäure kodierendes Basentriplet ersetzt sein
können. Mit Hilfe der vorstehend angegebenen vollständig aufge-
klärten Struktur des L-HicDH-Gens ist es erstmals möglich, gen-
technologisch L-HicDH herzustellen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung
eine DNA-Teilsequenz des vorstehend beschriebenen L-HicDH-Gens,
nämlich die Positionen 315, 316, 317 oder 318 bis jeweils 328,
wobei diese DNA-Teilsequenz an beliebiger Position um 1, 2 oder
3 Basen verkürzt oder verlängert sein kann oder wobei 1, 2 oder
3 Basen der DNA-Teilsequenz durch jeweils eine andere Base er-
setzt sein können. Die genannte DNA-Teilsequenz kann man zur
Translationsinitiation für die Herstellung von Genprodukten in
gram-positiven oder gram-negativen Mikroorganismen verwenden,
beispielsweise in E. coli.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung
eine DNA-Teilsequenz des vorstehend beschriebenen L-HicDH-Gens,
nämlich etwa 60 Basen aus dem Positions bereich von 1281 bis
maximal 1321, wobei die DNA-Teilsequenz an beliebiger Position
um 1, 2 oder 3 Basen verkürzt oder verlängert sein kann oder
wobei 1, 2 oder 3 Basen der DNA-Teilsequenz durch jeweils eine
andere Base ersetzt sein können. Diese DNA-Teilsequenz lässt
sich als Transkriptions-Terminator für die Herstellung von Gen-
produkten in gram-positiven oder gram-negativen Mikroorganismen
verwenden, beispielsweise in E. coli. Beispielsweise kann die
DNA-Teilsequenz am 3'-Terminus des Gens des gewünschten Genpro-
dukts angehängt verwendet werden, insbesondere als einziger
Transkriptions-Terminator.
Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfaßt die Erfindung Expressionsvektoren zur Expression von gewünschten Genprodukten in gram-positiven oder gram-negativen Mikroorganismen, beispielsweise in E. coli, wobei diese Expressionsvektoren eine vorstehend beschriebene DNA-Teilsequenz zur Translationsinitiation und/oder eine vorstehend beschriebene DNA-Teilsequenz als Transkriptions-Terminator umfassen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfaßt die Erfindung Expressionsvektoren zur Expression von L-HicDH in E. coli, wobei diese Vektoren das L-HicDH-Gen umfassen, das vorstehend beschrieben ist.


Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung das Enzym L-HicDH der folgenden Aminosäuresequenz:

```
<table>
<thead>
<tr>
<th>START</th>
<th>RBS</th>
<th>MARKIGILGLG</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>TACGACAAAAACAAATTGCGTGATATTATATGCAAGTGTGAATTATCGGCTTGGAG</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>NGAAAHAVLAIAGGYVADYV</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>AACGTTGGCGTCGACGTACGCAAGATTGATTGACACAGTGATGAGCCGACTACGTC</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>FDIAKVKADQIDFDQDAM</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>TTTATTGATGCAAAACGAAAGCGCGAGCTGATTCATTTCAAGCAGCAATG</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>ANLEAHGNIVINDWAAALADA</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>GCACACTTGGGAGCGACGTTAACATTGTGATTACGGATTTGGGCGACTTGGCTGATGCT</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>DVIVSTLGNIKLQQDNPTGOD</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>GATGTGTGATTTCAACACAGGAAACATCGTATGCAACAAGCAGCACAAACCCCGGGTAC</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>RFAELKFTSSMVQSVGNTNLK</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>CGTTTTGTCGATTGATTTACCACGCAGATGCTGGTACAATCAGTGACACAAACCTGAAAG</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>ESFGHVLYLVSISNPVDVITA</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>GAATCTGGTTCCACCGCATTTGCTGATTTCAACCCCGGTACGATTTACGAC</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
```
- 6 -

721
TTGTTCCAACACGGTGAGTGGTGTTTCCAACAGTTACGGGATACCTGTT

781
GACACGGCCCGTGATGAAATCGAATCTAATGTCGAAGTTGACGTGAGAAC

841
TCAGGTCTAATGATGATGAGTGTAACAGAATCTCAGTCGACAGTTGGTCA

901
GTGATGGCTCAACAACTGACGTGGCTGATGCGTGGGATATGGCCTGACCTG

961
GAAAGATGAGCGTACGAAAGCTATGACTTGAGAAGTGGTGACTGAGAAT

1021
GGTGTACACGCTCAATCCGATTTGCGCAAGGCTTTATGCTGACGGCATGCTGA

1081
TTGTTTGCTCAGATGCGATGAAATGTACTTGTCTACCCAGCAGTTAT

1141
GGTCGCGATGTCGCTTGGCCAGAAAACGGCATGGTACGGGATGACCAAGAAAG

1201
CTTTGCAATCAGGACTCATCACAACACGTTTGCAAGAAATTTGACTGACACTCTA

PUTATIVE TERMINATOR

1261
AAACATCAAGGGGCTCTCAATCGTGATGGGACACCTTTTTTTCTATTTTGATGAAA

wobei die folgenden Buchstaben bedeuten:

A = Alanin
D = Asparaginsäure
E = Glutaminsäure
F = Phenylalanin
G = Glycin
H = Histidin
I = Isoleucin
K = Lysin
L = Leucin
M = Methionin
N = Asparagin
P = Prolin
Q = Glutamin
R = Arginin
S = Serin
T = Threonin
V = Valin
W = Tryptophan
Y = Tyrosin
wobei das Enzym in beliebiger Position um 1, 2 oder 3 Aminosäuren verkürzt oder verlängert sein kann oder wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure ersetzt sein kann.


Der erfindungsgemäße E.-coli-Stamm 5520 kann als Ausgangsmaterial dienen, um mit Hilfe von Routinemethoden alle anderen Gegenstände der Erfindung herzustellen oder zu benutzen.

Beispiel 1

(Schauer et al. 1987) lieferte einen hoch induzierbaren Klon, der im Zytoplasma bis zu 35% des gesamten Zellproteins L-HicDH in löslicher und voll aktiver Form bildet. Die Codon-Verwendung korrespondierte mit der anderer Lactobacillus-Gene, die kloniert worden sind. Es ist eine typische Shine-Dalgarno-Sequenz vorhanden, und eine Schlaufenstruktur am 3'-Ende des Gens stellt eine starke Terminator-Sequenz dar. Das Gen kodiert für eine Protein-Untereinheit von 34 kDa.
Literatur


1. L-HicDH-Gen, nämlich Positionen 328 bis 1261 oder bis 1264 oder bis 1287 oder bis 1270 oder bis 1273 oder bis 1276 der folgenden DNA-Sequenz:

```
START RBS MARKIGILGLG
301 TACGACAAAAAATTTGCTAGTTATATGCATGAGATTATTGCAGCTCTGAC

NVGAHAVHLIAQGVADDYV
361 AACGTTGGGGCTGAGTACGCAAGGTGAATTTCGCAAAGGTGACACCTGCT

FIDANEAKVKEADQIDFDQSTDAM
421 TTTATTGATGCAGCAGAAGAGAACAAAGTTGGAAGGCTGATCACAATTGATTTCACAAGACCAATG

ANLEAHGNIKINDWAALADA
481 GCAGAATCTGAGAGCCACCGGATACCTGTTTATAGCTGATTTCAAACCCGTCGACAGATACCTGAC

DVVISGLNKLQQDNPTGD
541 GATGTGTATTTTCAACACTGCGGGACATCAAGTTGCAACAGCAACACCAACCGGTGAC

RFALKEKFTSSMVQSVGTNKL
601 CGTTTTCGATGTATTTAACGACATGTGCTGACACACACTGTTGCAACAGGTGAC

ESGFHGVPLVVISNPVDVITA
661 GAATCGTTGGCTCAGTAACCCCGGTATTTTCAACACCGTACGCTGATACCCGCC

LFQHVTGFPAHKVIGTGTTL
721 TTCTTCAACACGTGAATTTTCGTTTCAACACCGGTACGCTGATTTCGAC

DTARMQRAVGEAFOLDPRSV
781 GACAGGCGCGCTATGCAACGTTGCTGAGGCGCTTGATTGTGATCCAGCCTGCTGTT

SGYNLGEHGNQSOFVAWSTVR
841 TCAGTTTACGCACTTTGCTGAGAGCAGCTAATCACAATCTGCTGCTGATTACCCGCC

VMQPITLADAGOIDLAIAI
901 GTGATGCGTTAACAAATCAGTTGCTCAAGCTGATCTGCGCGATATTGACTTGGCGCGGACCT

EEEARKGGFTVNLNGKGYTSY
961 GAAGAGGAAGACAGATGACTAGGGCTTACACTGACAGTATTTGGAATAGGCTACACGAGTTAT

GVATSARIKAVKAMADAHAE
1021 GGTGTATTGCAACGTCAGCAATCAGCTGTTGATGCGCGCTGCTGCTGCTGAC

LVVSNRDRDMGMYLSYPAI
1081 TTGTTATCTCAATGCGATGCAAGACTGGAATGTACTTGTGCTACCCAGGATTATT

GRDGVYLAETTLDDLTDEQEK
1141 GGTGCGCAGCTGTCCTCTTGAGGAAACGGCTGTGCTGATGGACGACGAGTAGAAGAAAG

LLSQRODIEQQRFOEIVDTTL*
1201 CTTTTCGCATACGTCACAGTACCACAATCTCAGCTCAGCTGGATATCAGTCTA

PUTATIVE TERMINATOR
1261 AACACAAAAAGTGCGCTCTAATCTGTTGGATGACACCGACTTTTTCTAATTGCGATGAAA
```
wobei das Gen an beliebiger Position um 1, 2 oder 3 Basentriplets verkürzt oder verlängert sein kann oder wobei ein Basentriplet des Gens durch ein anderes Basentriplet ersetzt sein kann oder wobei ein oder mehrere Basentriplets durch eine dieselbe Aminosäure kodierendes Basentriplet ersetzt sein können.

2. DNA-Teilsequenz, nämlich Positionen 315, 316, 317 oder 318 bis jeweils 328 der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, wobei die DNA-Teilsequenz an beliebiger Position um 1, 2 oder 3 Basen verkürzt oder verlängert sein kann oder wobei 1, 2 oder 3 Basen der DNA-Teilsequenz durch jeweils eine andere Base ersetzt sein können.

3. DNA-Teilsequenz, nämlich etwa 60 Basen aus dem Bereich ab Position 1261 bis maximal Position 1321 der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, wobei die DNA-Teilsequenz an beliebiger Position um 1, 2 oder 3 Basen verkürzt oder verlängert sein kann oder wobei 1, 2 oder 3 Basen der DNA-Teilsequenz durch jeweils eine andere Base ersetzt sein können.

4. Verwendung einer DNA-Teilsequenz gemäß Anspruch 2 zur Translationsinitiation für die Herstellung von Genprodukten in gram-positiven oder gram-negativen Mikroorganismen.

5. Verwendung einer DNA-Teilsequenz gemäß Anspruch 3 als Transkriptions-Terminator für die Herstellung von Genprodukten in gram-positiven oder gram-negativen Mikroorganismen.


7. Verwendung nach einem der Ansprüche 4, 5 oder 6 in E. coli.
8. Expressionsvektoren zur Expression von gewünschten Genprodukten in gram-positiven oder gram-negativen Mikroorganismen, wie E. coli, umfassend eine DNA-Teilsequenz gemäß Anspruch 2 und/oder Anspruch 3.


10. E.-coli-Stamm für die Herstellung von L-HicDH mit Hilfe eines das L-HicDH-Gen gemäß Anspruch 1 umfassenden Expressionsvektors.

11. E.-coli-Stamm nach Anspruch 10, nämlich DSM 5520, oder davon abgeleiteter E.-coli-Stamm.

12. L-HicDH der folgenden Aminosäuresequenz:

```
START RBS MARK I G I I G L G
TACGACAAACCAATTTTGGGTTATATGGAAGCGACCTAAGATTTACGGGCTTGGA
N V G A A V A H G L I A Q V A O D D Y V
AAGCTTTGGGCTCAGTATGCGACCAACTGATTGATTCACAAAGGTGTAGCGACGACTACGC
F I D A N E A K V K A D Q I D F Q D A M
TTATTTGATCGAACAAACAGGAAAGCTGAAAGGCGTGATCAATTGATTTTCAAAGCGAATG
A N L E A H G N I V I N D W A A L D A
GCAGAATCTTGAAAGCGCAGCTAACCATGTTAGAACCAGCTGGGCACTTGGTCTGTGCT
D V V I S T L G N I K L Q Q D N P T G D
GATGTTTGTATTCTCAACATGGGGAAACATCAATTGTGAAGTGGCGTCAGCTGCTGATGAC
R F A E L K F T S S M V Q S V G T N L K
CGTTTTGTGATGTTAAGTCTTACCGACGCATGCTGCAATCAGTCGGCAAAAACCATGAGAG
E S G F H H G V L V V I S N P V D V I T A
GAATCTGTGTTCACCGGCATATTGCTGATTTCACACCCGCGTCAGCTGTAATACGCGCC
L F Q H T G F P A H K V I G T G T L L
TTGTCAACACGTGACTTTTCCCAGCTCAACAGTTATCAGACGATGATTTTGAAGCCCTGATTTGCTTC
D T A R M Q R A V G E A F D L D P R S V
GACACCGGCCGTATGCAGACTGGTTCAGGCGCTTATGATTTTGAAGCTCAGCTTGCCTGCT
S G Y N L G H E H G N S Q F V A W S T V R
TCAGGTTACAATTTGGTGGACGAGCTACATCACAATTCGTAGGCTGTTGCTACACGGTGGC
V M G Q P I V T L A D AG D I D L A A I
GTGATGCTGCTAACACATCGTGACGTTGGCTATGCGGCGCATATTGACTTGGCAGCCATC
```
wobei die folgenden Buchstaben bedeuten:

A = Alanin
D = Asparaginsäure
E = Glutaminsäure
F = Phenylalanin
G = Glycin
H = Histidin
I = Isoleucin
K = Lysin
L = Leucin
M = Methionin
N = Asparagin
P = Prolin
Q = Glutamin
R = Arginin
S = Serin
T = Threonin
V = Valin
W = Tryptophan
Y = Tyrosin

wobei das Enzym in beliebiger Position um 1, 2 oder 3 Aminosäuren verkürzt oder verlängert sein kann oder wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure ersetzt sein kann.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

**International Application No:** PCT/EP 90/01530

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC:

- C 12 N 15/53, C 12 N 9/04, C 12 P 7/42, C 12 N 15/74, C 12 N 1/20

**Int.Cl.:** (C 12 N 1/20, C 12 R 1:19)(C 12 N 9/04, C 12 R 1:19)

## II. FIELDS SEARCHED

<table>
<thead>
<tr>
<th>Classification System</th>
<th>Classification Symbols</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Int.Cl.:</td>
<td>C 12 N, C 12 P</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched.

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

<table>
<thead>
<tr>
<th>Category</th>
<th>Citation of Document, 13 with indication, where appropriate, of the relevant passages</th>
<th>Relevant to Claim No.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>X</td>
<td>EP, A, 0103210 (GESELLSCHAFT FUR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG mbh) 21 March 1984 see the whole document</td>
<td>12,13-14</td>
</tr>
<tr>
<td>Y</td>
<td>--.</td>
<td>1-11</td>
</tr>
</tbody>
</table>

### Notes:
- "**Y**" 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
- "**X**" document containing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "**E**" document containing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "**O**" document concerning the same subject matter as the invention
- "**L**" document concerning a technical subject matter not directly related to the invention
- "**P**" document published prior to the international filing date but not later than the priority date claimed
- "**F**" 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
- "**W**" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or 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.

## IV. CERTIFICATION

**Date of the Actual Completion of the International Search:**

5 December 1990 (05.12.90)

**International Searching Authority:**

European Patent Office

**Date of Mailing of this International Search Report:**

28 December 1990 (28.12.90)

**Signature of Authorized Officer:**
<table>
<thead>
<tr>
<th>Category</th>
<th>Citation of Document, with indication, where excerpts, of the relevant passages</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>&quot;Cloning sequencing and expression of the L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase-encoding gene of lactobacillus confusus in escherichia coli&quot;, pages 263-270, see the whole article</td>
</tr>
</tbody>
</table>
ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. EP 9001530 SA 39756

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 19/12/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Patent document cited in search report</th>
<th>Publication date</th>
<th>Patent family member(s)</th>
<th>Publication date</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>DE-A- 3374695</td>
<td>07-01-88</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>JP-A, B, C59074983</td>
<td>27-04-84</td>
</tr>
</tbody>
</table>

For more details about this annex: see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82.
# Internationaler Recherchebericht

## Klassifikation des Anmeldungsgegenstands

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC:


### Recherchierte Sachgebiete

Räumlicher und nicht zum Mindestanlauf gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen.

### Einschlägige Veröffentlichungen

<table>
<thead>
<tr>
<th>Art</th>
<th>Kennzeichnung der Veröffentlichung</th>
<th>Betr. Anspruch Nr.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>X</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Notizen:**
- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" Veröffentlichung, die gleichzeitig mit dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die genannt ist, wenn eine Prioritätsangabe nicht durchgeführt werden soll und die von einem anderen im Rechengericht genehmigten Veröffentlichung beigefügt werden soll oder die von einem anderen inbetriebengang einen anderen 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" Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegende Prinzipien oder der ihr zugrundeliegende Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderische 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

## Bescheinigung

<table>
<thead>
<tr>
<th>Datum des Abschlusses der internationalen Recherche</th>
<th>Abmeldedatum des internationalen Rechercheberichts</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>5. Dezember 1990</td>
<td>2.8.12.90</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Internationale Recherchenberichte

Europäisches Patentamt

Unterschrift des bevollmächtigten Beispruchs

Alfredo Preis

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 21 Januar 1985)
<table>
<thead>
<tr>
<th>Art</th>
<th>Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile</th>
<th>Begr. Anspruch Nr.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Y</td>
<td></td>
<td>1-11</td>
</tr>
</tbody>
</table>
ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR. EP 9001530
SA 39756

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familiemitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 19/12/90. Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument</th>
<th>Datum der Veröffentlichung</th>
<th>Mitglied(er) der Patentfamilie</th>
<th>Datum der Veröffentlichung</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>DE-A- 3374695</td>
<td>07-01-88</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>JP-A, B, C59074983</td>
<td>27-04-84</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang: siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82