



(12) PATENT

(19) NO

(11) 330796

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/37 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12P 7/42 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20025126	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.04.26 PCT/JP2001/03645
(22)	Inng.dag	2002.10.25	(85)	Videreføringsdag	2002.10.25
(24)	Løpedag	2001.04.26	(30)	Prioritet	2000.04.26, JP, 125449/00
(41)	Alm.tilgj	2002.12.20			
(45)	Meddelt	2011.07.18			
(73)	Innehaver	Meiji Seika Kaisha Ltd, 4-16, Kyobashi 2-chome, Chuo-ku, JP-104-0031 TOKYO , Japan Horst Kleinkauf, c/o Technische Universität Berlin, Franklinstrasse 29, D-10587 Berlin, DE-, Tyskland Rainer Zocher, c/o Technische Universität Berlin, Franklinstrasse 29, D-10587 Berlin, DE-, Tyskland Takeshi Murakami, c/o Microbiological Resources & Techn Labs, Meiji Seika Kaisha Ltd, 788, Kayama, Odawara-shi, Kanagawa-ken, JP-, Japan Naoki Midoh, c/o Pharmaceutical Technology Labs, Meiji Seika Kaisha Ltd, 788, Kayama, Odawara-shi, Kanagawa-ken, JP-, Japan Koichi Miyamoto, c/o Pharmaceutical Technology Labs, Meiji Seika Kaisha Ltd, 788, Kayama, Odawara-shi, Kanagawa-ken, JP-, Japan			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Acapo AS, Postboks 1880 Nordnes, 5817 BERGEN, Norge			
(54)	Benevnelse	Protein, polynukleotid, polynukleotidsekvens, rekombinant vektor, ikke-human vert, samt fremgangsmåter for å produsere D-fenylmelkesyre hydrogenase, D-fenylmelkesyre og substansen PF1022 eller derivater derav			
(56)	Anførte publikasjoner	WO0118179 A1 , EP0780468 , WO9720945 A1 , Hayao T. et al., 1991. D-Lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. J. Biol.Chem, nr.19, s. 12588-12594. , WO0118219 A1			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives D-fenyllaktat dehydrogenase som er et protein som har aminosyresekvensen representert med SEKV. IN. NR 2, eller en aminosyresekvens avledet derfra med en eller flere modifikasjoner valgt blant substitusjon, deletering, addisjon og innskudd, og som har D-fenyllaktat dehydrogenase aktivitet. Et gen som omfatter en nukleotidsekvens som koder for D-fenyllaktat dehydrogenase, for eksempel nukleotidsekvensen representert med SEKV. ID Nor. 1.

Område for oppfinnelsen

5

Den foreliggende oppfinnelse vedrører et protein, et polynukleotid, en polynukleotidsekvens, en rekombinant vektor, en ikke-human vert, samt fremgangsmåter for å produsere D-fenylmelkesyre hydrogenase, D-fenylmelkesyre og substansen PF1022 eller derivat derav slik det er angitt i innledningen i de selvstendige patentkravene.

10

Bakgrunn og teknikkens stilling

15

D-fenylmelkesyre er en forløper for substansen PF1022 [syklo(D-laktyl-L-N-metylleucyl-D-3-fenyllaktyl-L-N-metylleucyl-D-laktyl-L-N-metylleucyl-D-3-fenyllaktyl-L-N-metylleucyl)] som produseres av den filamentøse soppstammen PF1022 (*Mycelia sterilia*, FERM-BP-2671) som tilhører *Agonomycetales* (T. Sasaki, et al., J. Antibiotics, (1992) vol 45, p 692)). Nylig ble et enzym som direkte produserer substansen PF1022 og et gen som koder for dette enzym beskrevet (WO01/18179A1). Videre er det kjent at idet et fenylmelkesyrederivat tilsettes fra utsiden under dyrking av substans PF1022-produserende stamme i et væskemedium, kan en ny substans PF1022 produseres hvori det nye fenylmelkesyrederivat inkorporeres (WO 97/20945). I dette tilfellet er en forløper som kan tilsettes hensiktsmessig et (R)-2-hydroksyderivat.

25
30

Visse typer enzymer produsert av mikroorganismer er kjent til spesifikt å produsere optisk aktive forbindelser, så som D-melkesyre (H. Taguchi, et al., J. Biol. Chem., (1991), vol 266, p 12588)). Videre er det et antall rapporter på fremgangsmåter for å produsere industrielt nyttige forbindelser så som (R)-2-hydroksy-4-fenylsmørsyre

35

ved anvendelse av visse typer enzymer eller mikro-organismer som produserer nyttige enzymer (Japansk Patent Nr 2750017, Japansk Patent Nr 2752754, Japansk Patent Nr 2774341, Japansk Patent Nr 2873236, Japansk Patent
5 Publikasjon Nr 61271/1994, Japansk Patent Allmenn Tilgjengelig Publikasjon Nr 19774/1994, og Japansk Allmenn Tilgjengelig Publikasjon Nr 75797/1998).

10 WO01/18179 beskriver enzymer som syntetiserer sykliske depsipeptider og gener derav.

EP0780468 beskriver en metode for å tranfomrere stamme PF1022 som produserer et syklisk depsipeptid.

15 Publikasjonen av Hayao et al., 1991, (D-Lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2 -hydroxyacid dehydrogenase family. J. Biol. Chme, nr. 19, s. 12588-12594) omtaler genet som koder for D-melkesyre dehydrogenase fra *Lactobacillus plantarum* som har blitt
20 sekvensert og uttrykt i E. coli.

WO01/18219 beskriver en promotor og en terminator som funksjonerer synkront med uttrykking av et endogent gen i filamentøs sopp.

25

Enzymatiske reaksjoner er kjennetegnet ved å karakterisere målforbindelser mer selektivt og effektivt enn kjemisk syntese. På den annen side er det nødvendig å søke etter enzymer som spesifikt virker på målforbindelser pga. at
30 substratspesifisiteten for hvert enzym er begrenset. Så langt har det ikke vært noen rapporter på et dehydrogenaseenzym som er spesifikt for D-fenylmelkesyre avledet fra mikroorganismer.

35

Sammendrag av oppfinnelsen

- Oppfinnerne av foreliggende oppfinnelse har med suksess isolert et enzym som spesifikt reduserer fenylpyrodruesyre og produserer D-fenylmelkesyre, nemlig D-fenylmelkesyre dehydrogenase (D-PLDH), og et gen som koder for dette enzym. Videre har oppfinnerne med suksess i vesentlig grad klart å uttrykke dette gen i *Escherichia coli*.
- 10 Et formål med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en D-fenylmelkesyre dehydrogenase. Et annet formål med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe et gen som koder for D-fenylmelkesyre dehydrogenase.
- 15 Et ytterligere formål med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en rekombinant vektor og en transformant for å uttrykke D-fenylmelkesyre dehydrogenase, og en fremgangsmåte for å produsere D-fenylmelkesyre dehydrogenase.
- 20 Et ytterligere formål med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe et masseproduksjonssystem for substansen PF1022 og derivater derav, og en fremgangsmåte for å produsere samme.
- 25 Den foreliggende oppfinnelse vedrører således et protein kjennetegnet ved at det omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av følgende sekvenser:
- (a) aminosyresekvensen i SEKV. ID. NR. 2, og
 - (b) en modifisert aminosyresekvens av aminosyresekvensen i SEKV. ID. NR. 2 som har én eller flere
- 30 modifiseringer valgt fra en substitusjon, en deletering, en addisjon og et innskudd, og som har D-fenylmelkesyre dehydrogenase aktivitet.

Videre omfatter den foreliggende oppfinnelse et protein kjennetegnet ved at det kodes for av en nukleotidsekvens valgt blant gruppen som består av følgende sekvenser:

- (c) DNA-sekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 1,
- 5 (d) en nukleotidsekvens som har minst 70% sekvens-identitet med DNA-sekvensen i SEKV. ID. NR. 1, og som koder for et protein som har D-fenylmelkesyre dehydrogenaseaktivitet,
- 10 (e) en nukleotidsekvens som hybridiserer med DNA-sekvensen i SEKV. ID. NR. 1 under stringente betingelser, og som koder for et protein som har D-fenylmelkesyre dehydrogenaseaktivitet.

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også et poly-
15 nukleotid, kjennetegnet ved at det koder for proteinet i samsvar med krav 1.

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også et poly-
nukleotid kjennetegnet ved at det omfatter DNA-sekvensen
20 ifølge SEKV. ID. NR. 1.

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også en poly-nukleotidsekvens, kjennetegnet ved at den er valgt fra gruppen som består av de følgende sekvenser:

- 25 (c) DNA-sekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 1,
- (d) en nukleotidsekvens som har minst 70% sekvensidentitet med DNA-sekvensen i SEKV. ID. NR. 1, og som koder for et protein som har D-fenylmelkesyre dehydrogenaseaktivitet,
- 30 (e) en modifisert DNA-sekvens av DNA-sekvensen i SEKV. ID. NR. 1 som har én eller flere modifiseringer valgt fra en substituert, en deletering, en addisjon og et innskudd, og som koder for et protein som har D-fenylmelkesyre dehydrogenaseaktivitet, og
- 35 (f) en nukleotidsekvens som hybridiserer med DNA sekvensen i SEKV. ID. NR. 1 under stringente betingelser,

og som koder for et protein som har D-fenylmelkesyre dehydrogenaseaktivitet.

En foretrukket utførelse av nevnte polynukleotid er
5 kjennetegnet ved at d) er et polynukleotid som har minst 80% sekvensidentitet med DNA-sekvensen i SEKV. ID. NR. 1.

En foretrukket utførelse av nevnte polynukleotid er
kjennetegnet ved at at d) er et polynukleotid som har
10 minst 90% sekvensidentitet med DNA-sekvensen i SEKV. ID. NR. 1.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en rekombinant vektor, kjennetegnet ved at den omfatter polynukleotidet
15 ifølge et av kravene 3-7.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en ikke-human vert, kjennetegnet ved at den omfatter den rekombinante vektor i krav 8.

20 En foretrukket utførelse av nevnte vert uttrykker en D-fenylmelkesyre dehydrogenase.

En foretrukket utførelse av nevnte vert er en substans
25 PF1022-produserende mikroorganisme.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en fremgangsmåte for å produsere en D-fenylmelkesyre hydrogenase, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter trinnene å
30 dyrke verten ifølge krav 9, 10 eller 11, og oppta D-fenylmelkesyre dehydrogenase fra dyrkningsmediet.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en fremgangsmåte for å produsere D-fenylmelkesyre, et derivat derav
35 eller en analog derav kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter trinnene å reagere fenylpyrodruesyre, et derivat

derav eller en homolog derav, med proteinet ifølge krav 1, verten ifølge krav 9, 10 eller 11, et ekstrakt av verten, en kultur av verten, eller et enzym rensset fra kulturen, og oppsamle nevnte D-fenylmelkesyre, derivat eller analog.

5

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en fremgangsmåte for å produsere substansen PF1022 eller et derivat derav, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter trinnene å dyrke verten ifølge krav 11 og oppsamle substansen PF1022 eller derivatet derav fra dyrkningsmediet.

10

Kort beskrivelse av figuren

Fig. 1 viser en fremgangsmåte for å konstruere plasmid pDPLDH-1.

15

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

20

Deponering av mikroorganismer

Stammen PF1022 beskrevet i Eksempel 1-1 ble deponert ved The International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-1 Higashi 1-Chome, Tsukuba, Ibaraki, Japan), den 24. januar 1989. Katalognummer er FERM BP-2671.

25

Escherichia coli (DH5 α)-stammen transformert med plasmid pDPLDH-1 beskrevet i Eksempel 3-3 ble deponert ved The International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, den 12. april 2000. Katalognummer er FERM BP-7545.

30

35

Gen og protein

Det tilveiebringes en D-fenylmelkesyre dehydrogenase og et gen derav.

5

Et enzym virker på 2-okso-3-fenylpropionisk syre (noen ganger benevnt som «fenylpyrodruesyre» heretter) og reduserer den til å omdannes til (R)-2-hydroksy-3-fenylpropionisk syre. Derivater eller analoger av D-fenylmelkesyre kan fremstilles ved tidligere å modifisere substratet, fenylpyrodruesyre.

Eksempler av derivater av D-fenylmelkesyre inkluderer p-aminofenylmelkesyre, p-nitrofenylmelkesyre, og p-hydroksy-fenylmelkesyre. I dette tilfellet kan f.eks. p-amino-fenylpyrodruesyre, p-nitrofenylpyrodruesyre og p-hydrok-syfenylpyrodruesyre anvendes som et substrat for å syntetisere D-fenylmelkesyrederivater.

Eksempler på analoger av D-fenylmelkesyre inkluderer (R)-2-hydroksy-4-fenylsmørsyre som anvendes som et materiale for antihypertensjonsmiddel. I dette tilfellet kan f.eks. 2-okso-4-fenylsmørsyre anvendes som et substrat for syntese av D-fenylmelkesyreanalogen.

25

I sekvens (b) kan antallet modifiseringer f.eks. være én til flere, mer spesifikt 1-6.

I sekvens (e) kan antallet modifiseringer f.eks. være én til flere dusin.

30

I sekvens (b) og sekvens (e) kan multiple modifiseringer, som kan være de samme eller forskjellige, introduseres.

Sekvens (d) kan ha fortrinnsvis minst 80%, mer fortrinnsvis minst 90%, og mest fortrinnsvis minst 95% homologi til DNA-sekvensen i SEKV. ID. NR. 1.

- 5 I sekvens (f) angir termen «stringente betingelser» at en membran etter hybridisering vaskes ved en høy temperatur i en løsning av lav saltkonsentrasjon, f.eks. ved en 0,2xSSC-konsentrasjon (1xSSC:15 mM trisodiumcitrat, 150 mM natriumklorid) i en 0,1% SDS-løsning ved 60°C i
10 15 min.

For sekvens (b) kan det avgjøres om «den har D-fenylmelkesyre dehydrogenaseaktivitet» eller ikke, ved f.eks. å tilveiebringe et substrat for D-fenylmelkesyre dehydrogenase (f.eks. fenylpyrodruesyre) og et reduksjonstypekoenzym, dvs. nikotinamid-adenin-nukleotidfosfat (NADPH),
15 reagere et protein som skal testes, og deretter måle den fysiokjemiske forandring generert av enzymreaksjonen, så som en forandring i optisk tetthet av nikotinamid-adenin-
20 dinukleotid-fosfatet og/eller en kvantitativ forandring i produktet, dvs. D-fenylmelkesyre (se Eksempel 3).

For sekvensene (d), (e) og (f) kan det evalueres om de «koder for et protein som har D-fenylmelkesyre dehydrogenaseaktivitet» eller ikke, f.eks. undersøkes ved å uttrykke en nukleotidsekvens som skal testes i en vert, reagere det resulterende protein med et substrat for D-fenylmelkesyre dehydrogenase (f.eks. fenylpyrodruesyre) og et reduksjonstype-koenzym, dvs. nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat (NADPH) og deretter måle fysiokjemiske forandringer generert av enzymreaksjonen, så som en forandring i optisk tetthet av nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat og/eller en kvantitativ forandring i produktet, dvs. D-fenylmelkesyre (se Eksempel 3).

Gitt aminosyresekvensen av et enzym i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan nukleotidsekvensene som koder for denne enkelt bestemmes, og forskjellige nukleotidsekvenser som koder for aminosyresekvensen avbildet i SEKV. ID. NR. 2 kan selekteres. Således omfatter nukleotidsekvensene som koder for et enzym i samsvar med foreliggende oppfinnelse enhver DNA-sekvens som koder for den samme aminosyresekvens og har degenerative kodoner, i tillegg til en del eller alle av DNA-sekvensene i SEKV. ID. NR. 1, og videre inkludere RNA-sekvenser korresponderende til disse sekvenser.

Opprinnelsen til et enzym og et gen i samsvar med foreliggende oppfinnelse er ikke spesielt begrenset, og enhver mikroorganisme som kan produsere et enzym i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan anvendes; substans PF1022-produserende mikroorganisme (*Mycelia sterilia*, FERM BP-2671 er foretrukket).

Den N-terminale aminosyresekvens av et enzym i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan bestemmes, f.eks. ved å applisere enzymer på SDS-polyakrylamid-elektroforese, elektrisk overføre det resulterende enzymbånd til en polyvinylidenfluorid (PVD)-membran eller lignende, og deretter analysere det med en proteinsekvenserings-maskin.

Den indre aminosyresekvens av et enzym i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan bestemmes f.eks. ved delvis oppkutting av enzymet med en proteinase eller lignende, og deretter utføre de ovenfor angitte trinn etter SDS-polyakrylamid-gelelektroforese og et isoleringstrinn ved anvendelse av revers fasekromatografi.

Et gen i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan oppnås f.eks. som følger.

Et genomisk DNA ekstraheres fra en substans PF1022-produserende mikroorganisme og spaltes med egnede restriksjonsenzymmer, hvorefter et bibliotek omfattende det genomiske DNA av substans PF1022-produserende mikroorganisme
5 konstrueres ved anvendelse av en fag-vektor.

Alternativt kan totalt RNA ekstraheres fra substans PF1022-produserende mikroorganisme, cDNA korresponderende til mRNA fremstilles av en revers transkriptasereaksjon
10 ved anvendelse av en oligo-dT som en primer, hvorefter et bibliotek omfattende cDNA'en av substansen PF1022-produserende mikroorganisme konstrueres ved anvendelse av en fag-vektor.

15 Egnede primere syntetiseres basert på den N-terminale aminosyresekvens og den interne aminosyresekvens i D-PLDH. Polymerasekjedereaksjonen (PCR) utføres ved anvendelse av disse primere, og det genomiske DNA eller cDNA avledet fra substansen PF1022-produserende mikroorganisme som et tem-
20 plat, og således mangfoldiggjøres DNA-fragmentet av D-PLDH-genet. Det genomiske bibliotek eller cDNA-biblioteket screenes ved anvendelse av dette DNA-fragment som en probe. På denne måte kan hele regionen av D-fenylmelkesyre dehydrogenasegenet eller en region nødvendig for ekspre-
25 sjon isoleres. Etter bestemmelse av basesekvensene for disse DNAfragmenter, kan egnede restriksjonsenzym-spaltingssteder introduseres oppstrøms for translasjonsstart-kodon og nedstrøms for translasjonsstopp-kodon med PCR eller lignende for å oppnå et genfragment som inne-
30 holder D-fenylmelkesyre dehydrogenasegenet eksklusivt.

Rekombinant vektor

Det tilveiebringes en rekombinant vektor som omfatter en
35 nukleotidsekvens som koder for D-fenylmelkesyre dehydrogenase.

Fremgangsmåten og metoden for å konstruere en rekombinant vektor i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan være enhver av dem som vanligvis anvendes innen feltet genetisk
5 engineering.

Eksempler på vektoren som anvendt heri inkluderer vektorer som kan inkorporeres i et vertskromosom-DNA, og vektorer som har en selvreplikerbar autonom replikasjonssekvens som
10 kan foreligge som et plasmid i en vertscelle, f.eks. pUV-vektorer (f.eks. pUC18 og pUC118), pBluescriptvektorer (f.eks. pBluescript II KS+), og plasmider så som pBR322. Én eller flere kopier av genet kan foreligge i en vertscelle.

15 En rekombinant vektor kan konstrueres f.eks. ved operativt å ligere en promotor og en terminator, oppstrøms- og nedstrøms for nukleotidsekvensen som koder for en D-fenylmelkesyre dehydrogenase, respektivt, og dersom ønskelig
20 operativt ligere en genmarkør og/eller andre regulatoriske sekvenser.

Ligering av en promotor og en terminator til et gen i samsvar med foreliggende oppfinnelse og innsetting av en
25 ekspresjonsenhet til en vektor kan utføres med kjente metoder.

En promotor og en terminator som kan anvendes er ikke begrenset. Eksempler inkluderer regulatoriske sekvenser av
30 gener av glykolyseenzymmer, så som 3-fosfoglycerat-kinase og glutaraldehyd-3-fosfat dehydrogenase; regulatoriske sekvenser av gener av aminosyresyntetiserende enzymer, så som tryptofansyntase; regulatoriske sekvenser av gener av hydrolytiske enzymer, så som amylase, protease, lipase og
35 cellulase; regulatoriske sekvenser av gener for oksidasjonsreduksjonsenzymmer, så som nitratreduktase, orotidin-

5'fosfat dehydrogenase og alkohol dehydrogenase, og regulatoriske sekvenser av gener avledet av en substans PF1022produserende mikroorganisme, så som Abp1 beskrevet i WO 01/18219A1, som er sterkt uttrykt i substansen PF1022-
5 produserende mikroorganisme.

Et protein ifølge foreliggende oppfinnelse kan uttrykkes som et fusjonsprotein ved å ligere et gen i samsvar med foreliggende oppfinnelse til et fremmed gen som koder for
10 en translasjonsregion i et annet protein.

Introduksjonen av en genmarkør kan utføres f.eks. ved å introdusere et egnet restriksjonsenzymspaltingssete inn i en regulatorisk sekvens med en PCR-metode, innsette denne
15 inn i en plasmidvektor, og ligere et selektivt markørgen som et medikamentresistent gen og/eller et gen komplementerende til et ernæringskrav.

En selektiv markør kan hensiktsmessig selekteres avhengig av teknikken for å selekttere en transformant. F.eks. kan et medikamentresistent gen eller et gen komplementært til et ernæringskrav anvendes. Eksempler på det medikamentresistente genet inkluderer gener som gir resistens til destomycin, benomyl, oligomycin, hygromycin, G418, pleo-
25 mycin, fosfinotricin, ampicillin, kanamycin eller lignende. Eksempler på gener som komplementerer et ernæringsmessig krav inkluderer argB, pyr4, trpC, TRP1, niaD, LEU2 og URA3.

30 Produksjon av transformant og D-fenylmelkesyre dehydrogenase

I samsvar med foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en vert transformert med den ovenfor angitte vektor.

En vert som kan anvendes ifølge foreliggende oppfinnelse er ikke bestemt begrenset, og enhver mikroorganisme som kan anvende en vert for genetisk rekombinasjon kan benyttes. Eksempler på verten som kan anvendes inkluderer mikroorganismer, nemlig visse bakterier eller fungi, fortrinnsvis *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, gjær og filamentøs fungi, nærmere bestemt filamentøs fungi som kan produsere substansen PF1022, og mest fortrinnsvis stammen PF1022 (*Mycelia sterilia*, FERM BP-2671) og varianter derav.

En rekombinant vektor for genekspresjon kan introduseres inn i en vert med en ordinær metode. Eksempler på fremgangsmåten for introduseringen inkluderer elektroporeringsmetoder, polyetylenglykolmetoder, aglobakteriemetoder, litiummetoder og kalsiumkloridmetoder. En fremgangsmåte som er egnet for hver vert kan selekteres. Polyetylenglykolmetoden er foretrukket idet en substans PF1022 produserende mikroorganisme anvendes som en vert.

En transformant kan dyrkes i samsvar med en enhver ordinær metode ved å anvende et medium, dyrkningsbetingelser og lignende som er hensiktsmessig selektert. Som et medium kan konvensjonelle komponenter anvendes. Som en karbonkilde kan det anvendes glukose, sukrose, stivelsessirup, dekstrin, stivelse, glyserol, molasses, animalske- og vegetabiliske oljer, og lignende. Som nitrogenkilde kan det anvendes organiske eller uorganiske nitrogenforbindelser så som soyabønne-pulver, hvetekim, farma-media, cornsteep-liquor, bomullsfrø, buljong, polypepton, maltekstrakt, gjærekstrakt, ammoniumsulfat, natriumnitrat og urea. Dersom nødvendig kan natrium, kalsium, magnesium, kobolt, klorin, fosforsyre, svovelsyre og andre uorganiske salter som kan produsere ioner, så som kaliumklorid, kalsiumkarbonat, dikaliumhydrogenfosfat, magnesiumsulfat, monokaliumfosfat, sink-sulfat, manganes-sulfat, og kobber-

sulfat, effektivt tilsettes. Dersom nødvendig kan forskjellige vitaminer så som tiamin (f.eks. tiaminhydroklorid), aminosyrer så som glutaminsyre (f.eks. natriumglutamat) og asparagin (f.eks. DL-asparagin), nukleinsyrekomponenter så som nukleotider, og selektive medikamenter så som antibiotika tilsettes. Videre kan organiske og uorganiske substanser hensiktsmessig tilsettes for å fremme mikrobiell vekst og for å styrke produksjon av et enzym ifølge foreliggende oppfinnelse.

10

Dyrkningen kan utføres ved en ristekulturmetode under en aerob betingelse, en agiteringsdyrkningsmetode med lufting, eller en aerob neddykket dyrkningsmetode. Spesielt kan en aerob neddykket dyrkningsmetode være fordelaktig.

15 Noen verter kan dyrkes med en aerob dyrkningsmetode.

Et pH-område for medium er f.eks. 6-8. Dyrkningen kan utføres ved en ristedyrkningsmetode under en aerob betingelse, eller en agiteringsdyrkningsmetode med lufting. En egnet dyrkningstemperatur er 15°C til 60°C, fortrinnsvis ca. 20°C til 40°. Dyrkningstid er f.eks. 60-240 timer, fortrinnsvis ca. 8-168 timer.

25 Dyrkningen termineres idet mengden av D-fenylmelkesyre dehydrogenase i medium når dets topp, og D-fenylmelkesyredehydrogenase isoleres og renses fra kulturen.

Et enzym i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan isoleres og renses fra kulturen ved å knuse de dyrkede mikrobielle celler og behandle den resulterende cellefrie ekstrakt ved anvendelse av ordinære rensemetoder. F.eks. knuses mikrobielle celler gjenvunnet ved sentrifugering eller filtrering av kulturen ved fysiske måter, f.eks. ved ultrasonisk behandling, anvendelse av sjøsand, eller en mortar og støter, eller en maler ved anvendelse av en

30

35

- ballmølle, en Frenchpress, en fryse-crusher, en blander, en mikser eller lignende, hvoretter debris fjernes ved sentrifugering for å oppnå et cellefritt ekstrakt. I tilfellet hvor cellene gjenfunnet fra kulturen ved
- 5 sentrifugering eller filtrering ikke umiddelbart knuses, kan disse lagres ved frysing eller lyofilisering, og knuses ved behov. Deretter kan et enzym som har aktiviteten oppnås ved å behandle det cellefrie ekstrakt ved anvendelse av ordinære rensemetoder, så som ammonium-
- 10 sulfatfraksjoneringsmetoden, en ionebyttekromatografimetode, en affinitetskromatografimetode, en adsorpsjonskromatografimetode og en gelfiltreringsmetode, enkeltvis eller i kombinasjon.
- 15 I samsvar med foreliggende oppfinnelse tilveiebringes et masseproduksjonssystem for D-fenylmelkesyre dehydrogenase. Eksempler på en vert som kan anvendes som et system for masseproduksjon av D-fenylmelkesyre dehydrogenase inkluderer *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*,
- 20 gjær og filamentøs fungi.

Et enzym i samsvar med foreliggende oppfinnelse transformerer fenylpyruvatsyre til D-fenylmelkesyre. På den andre side syntetiseres substansen PF1022 fra 4 molekyler

25 av L-leucin, 2 molekyler av D-melkesyre og 2 molekyler av D-fenylmelkesyre ved et syklisk depsipeptid-syntetiserende enzym. Således korresponderer D-fenylmelkesyre som et råmateriale for syntetisering av substansen PF1022. Derfor kan substansen PF1022 produseres i store mengder dersom D-

30 fenylmelkesyre er rikelig uttrykt i substansen PF1022-produserende mikroorganisme. Således tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et masseproduksjonssystem for substansen PF1022, kjennetegnet ved at systemet transformeres slik at det uttrykker et enzym i samsvar med foreliggende

35 oppfinnelse. Substansen PF1022 er nyttig som et ormeform-

drivende middel for dyr (T. Sasaki, et al., J. Antibiotics, (1992) vol 45, p 692)).

5 En substans PF1022-produserende mikroorganisme som er nyttig som et system for masseproduksjon av substans PF1022 er fortrinnsvis en substans PF1022-produserende filamentøs fungi, mest fortrinnsvis substansen PF1022-produserende stamme *Mycelia sterilia* (FERM BP-2671).

10 En PF1022-produserende mikroorganisme kan videre transformeres av et som ikke er et enzymgen i samsvar med foreliggende oppfinnelse. F.eks. kan produksjonen av substans PF1022 forbedres ved å introdusere et gen av et enzym som virker i reaksjonsskjemaet for syntetisere
15 substansen PF1022, noen ganger sammen med en egnet promotor. Et eksempel på et slikt gen er et syklisk depsipeptidsyntetiserende enzym (WO 01/18179A1).

I en vert som ikke syntetiserer et substrat hvorpå et
20 enzym i samsvar med foreliggende oppfinnelse virker, dvs. fenylpyrodruesyre, derivat eller homolog substans derav, D-fenylmelkesyre, derivat eller homolog substans derav kan produseres ved å tilsette det manglende substrat, derivat eller homolog substans av substratet til kulturen eller
25 ved å transformere verten med et gen som koder for det manglende substrat, derivat eller homolog substans av substratet. Et eksempel på et slikt enzymgen er et gen involvert i biosyntesereaksjonsveien fra korismisk syre til p-aminofenylpyrodruesyre (WO 01/23542A1).

30 I en vert hvori genet er involvert i den biosyntetiske reaksjonsvei fra korismisk syre til p-aminofenylpyrodruesyre, syntetiseres p-aminofenylpyrodruesyre og et enzym i samsvar med foreliggende oppfinnelse omdanner p-amino-
35 fenylpyrodruesyre til p-aminofenylmelkesyre. Som et resultat utgjør den omdannede p-aminofenylmelkesyre et

råmateriale for substans PF1022-produksjonen, slik at et substrat PF1022-derivat hvori en benzenring modifiseres med en aminogruppe ved para-posisjon, dvs. [syklo(D-laktyl-L-Nmetylleucyl-D-3-(4-aminofenyl)laktyl-L-N-metylleucyl-D-laktyl-L-N-metylleucyl-D-3-fenyllaktyl-L-N-metylleucyl)] syntetiseres. Et substans-PF1022-derivat modifisert med en funksjonell gruppe så som en aminogruppe er nyttig som råmateriale for å syntetisere et sterkt aktivt substans-PF1022-derivat.

10

En rekombinant vektor anvendt for transformasjon er fortrinnsvis en ekspresjonsvektor hvor en regulatorisk sekvens (f.eks. promotor og terminator) som fungerer i PF1022-produserende mikroorganisme, er operativt ligert til et enzymgen i samsvar med foreliggende oppfinnelse, eller mest fortrinnsvis en ekspresjonsvektor hvori en regulatorisk sekvens, som fungerer i stammen PF1022 (*Mycelia sterilia*, FERM BP-2671), er operativt ligert til et enzymgen i samsvar med foreliggende oppfinnelse. Eksempel på en nyttig promotor for å forsterke ekspresjonen er Abp1-promotor (WO 01/18219A1).

20

EKSEMPEL

25

Den foreliggende oppfinnelse illustreres videre ved hjelp av de påfølgende eksempler som ikke er tiltenkt å begrense oppfinnelsen.

30 Eksempel 1: Isolering og rensing av D-PLDH

1. Fremstilling av mikrobielle celler.

Substansen PF1022-produserende mikroorganisme (*Mycelia sterilia*, FERM BP-2671) ble underlagt UV-bestråling eller NTG-behandling for å indusere mutering, og den resul-

35

terende substans PF1022-produserende stamme 432-26, hvor
PF1022-produktiviteten var forbedret, ble inokulert i 50
ml såmedium [1% gjærekstrakt, 1% maltekstrakt, 2% poly-
pepton, 2,5% glukose, 0,1% dikaliumhydrogenfosfat, 0,05
5 magnesiumsulfat (pH 7,0)] (WO 01/18179A1) i en egnet
beholder, og dyrket ved 26°C i 3 dager med risting for å
fremstille en primær såkultur. Denne kultur ble inokulert
inn i 500 ml medium beskrevet i WO 97/20945 i en egnet
beholder, og inkubert ved 26°C i 3 dager ved anvendelse av
10 en rotasjonsrister for å fremstille en sekundær såkultur.
Denne kultur ble inokulert inn i 500 ml av det samme
medium i en egnet beholder, og inkubert ved 26°C i 4-6
dager ved anvendelse av en rotasjonsrister. Etter dyrk-
ning, ble den resulterende kultur filtrert med sug ved
15 anvendelse av kommersiell nylonduk og en Büchner-trakt og
på samme tid ble mikrobielle celler vasket med deionisert
vann. En kake av mikrobielle celler ble oppnådd og umid-
delbart frosset ved -80°C og tørket i en frysetørker i 2
netter. De frysetørkede celler således fremstilt, ble
20 lagret ved -80°C i en lufttett beholder.

2. Ekstrahering og rensing av D-PLDH.

En blanding av 2 µl 0,1 M fenylpyrodruesyre, 2 µl 0,1 M
25 NADPH, bufferløsning A (10 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, pH=8)
og et valgfritt volum av en enzymprøveløsning for å
utgjøre et totalt volum av 100 µl ble reagert ved 26°C i 2
timer. Etter terminering av reaksjonen ved varmebehandling
ble reaksjonsløsningen analysert ved anvendelse av HPLC
30 (kolonne: L-kolonne ODS 4,6 Øx150 mm (Chemicals Evaluation
and Research Institute, Japan), mobilfase: 0,1 M natrium-
sulfat: acetonitril (3,9:1) isokratisk, gjennomstrømnings-
hastighet: 1 ml/min., temperatur: 40°C, UV-deteksjon:

- 210 nm)) og mengden av fenylmelkesyre produsert ble definert som aktiviteten av dette enzym. Videre ble optisk aktivitet av enzymreaksjonsproduktet analysert ved anvendelse av en annen HPLC (kolonne: CHIRALPAK WH 0,46
5 Øx25 cm (Daicel Chemical Industries, Ltd.), mobilfase: vandig 25 mM kobbersulfatløsning, gjennomstrømnings- hastighet: 1 ml/min., temperatur: 40°C, UV-deteksjon: 210 nm).
- 10 De følgende trinn ble alle utført ved 4°C. Ca. 40 g frysetørkede celler oppnådd i Eksempel 1-1 ble malt natten over i en ballmølle (ytre diameter av panne: 210 Ø mm, balldiameter: 35 Ø mm, Tokyo Garasu Kikai Co., Ltd.). Det resulterende finfordelte cellepulver ble grundig suspen-
15 dert i 1,5 l av en ekstraheringsbufferløsning (50 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, 50 mM kaliumklorid, pH=8), tilsatt til cellene. Cellesuspensjonen ble forsiktig omrørt i ca. 1 time ved anvendelse av en magnetisk rører. Deretter ble cellesuspensjonen sentrifugert ved 8000 rpm i 30 min., for
20 å gjenvinne ca. 1,2 liter supernatant ved anvendelse av en høyhastighetsavkjølt sentrifuge SCR20B (rotor nr RPR9, Hitachi Koki Co., Ltd.). Den gjenvunnede supernatant ble påført en kolonne (26 Øx300 mm) fylt med Red Sepharose CL6B (Amersham Pharmacia) som en vehikkel. Kolonnen ble
25 vasket med bufferløsning A inntil en ikke-adsorbert fraksjon ble fullstendig fjernet, hvorefter et protein eluert med bufferløsning A inneholdende 1 M kaliumklorid ble fraksjonert. En sammenstilt aktiv fraksjon ble underlagt gelkromatografi ved anvendelse av en kolonne (26 Øx950 mm)
30 fylt med Superdex 200 (Amersham Pharmacia), som en vehikkel. Den aktive fraksjon ble umiddelbart applisert på MonoQ10/10 (Amersham Pharmacia). Etter vasking av kolonnen med bufferløsning A, ble adsorberte proteiner eluert ved anvendelse av 0-0,3 M kaliumkloridgradient. Den resul-

terende sammenføyde aktive fraksjon ble fortynnet 10 ganger med bufferløsning A og ble forsynt til en kolonne (16 Øx100 mm) fylt med AMP-agarose (Amersham Pharmacia). En ikke-adsorbert fraksjon ble gjenvunnet, og umiddelbart
5 forsynt på en kolonne (5 Øx50 mm) fylt med hydroksyapatitt. En ikke-adsorbert fraksjon ble gjenvunnet, og adsorbert igjen på MonoQ10/10. Proteiner ble eluert ved anvendelse av 0-0,2 M kaliumkloridgradient. Polyakrylamid-elektroforese at den aktive fraksjon inneholdt omtrent et
10 enkelt protein med en molekylvekt på ca. 38 kDa.

3. Bestemmelse av interndel aminosyresekvens av D-PLDH.

Proteinet oppnådd i Eksempel 1-2 ble konsentrert og
15 isolert ved anvendelse av SDS-polyakrylamidgelelektroforese, og elektrisk overført på en PVDF-membran. Proteinet overført på PVDF-membranen ble farget med Coomassie Brilliant Blue for å bekrefte dets nærvær og lokalisering. Et stykke av PVDF-membranen hvor proteinet
20 var til stede ble kuttet ut og underlagt analyse av N-terminale aminosyresekvens ved anvendelse av en proteinsekvenser, som imidlertid resulterte i feil.

Proteinet oppnådd i Eksempel 1-2 ble konsentrert og
25 isolert ved anvendelse av SDS-polyakrylamidgelelektroforese og gelen ble farget med Coomassie Brilliant Blue. Et stykke av gelen inneholdende proteinet av interesse ble kuttet ut. Denne gel ble repeterende vasket med 200 µl av en avfargingsløsning (0,2 M ammoniumbikarbonat, 50% acetonitril, pH=8,0) i et lite testrør for å vaske ut Coomassie Brilliant Blue fra gelen, hvorefter gelen ble tørket under redusert trykk. Til den halvtørre gel ble det tilsatt 5 µl av bufferløsning B (0,2 M ammoniumbikarbonat, 0,02% Tween 20, pH=8) og deretter et 1/100 molart volum av trypsin.
35 Samblandingen fikk stå til henstand i ca. 10 min. for å

dispersere enzymet i gelen, hvorefter 200 µl bufferløsning B ble tilsatt og proteinet oppkuttet med enzymet ved 37°C i 48 timer. Enzymreaksjonen ble terminert ved trifluorediksyre, og reaksjonsløsningen ble gjenvunnet. Gelen ble

5 grundig vasket med 200 µl vaskeløsning (0,1% trifluorediksyre, 60% acetonitril) og vasken ble blandet med tidligere gjenvunnet reaksjonsløsning. Vaskingen ble ytterligere repetert 2 ganger for å gjenvinne trypsin-kuttet. Det gjenvunnede trypsinoppkuttete ble tørket under redusert trykk, hvorefter 60 µl destillert vann ble tilsatt

10 for å lage en peptidfragmentprøve oppkuttet av trypsin. Denne prøve ble underlagt kromatografi for fraksjonering (kolonne: C18, 0,21 Øx220 mm, gradient: 0,1% trifluorediksyre, 5% acetonitril -0,085% trifluorediksyre, 35%

15 acetonitril) ved anvendelse av et Modell 172 µ-preparativt HPLC-system (Perkin-Elmer Applied Biosystem). Av peptidfragmenttoppene som ble oppnådd ble to peptidfragmenter analysert for aminosyresekvenser og de følgende sekvenser ble bestemt.

20 Peptidfragment 1: ANVAGFVTTSEPK (SEKV. ID. NR. 3)
 Peptidfragment 2: AGDWVTK (SEKV. ID. NR. 4)

Eksempel 2: Isolering av cDNA for D-PLDH

25 1. Isolering av cDNA og konstruksjon av cDNAbibliotek.

Substans PF1022-produserende mikroorganisme (Mycelia sterilia, FERM BP-2671) ble underlagt UV-bestråling eller NTG-behandling for å indusere mutering, og den resul-

30 terende substans PF1022-produserende stamme 432-26, hvor PF1022produktiviteten var forbedret, ble inokulert i 10 ml såmedium [1% næringsstoff, 1% maltekstrakt, 2% polypepton, 2,5% glukose, 0,1% dikaliumhydrogenfosfat, 0,05% magnesiumsulfat (pH=7,0)] (WO 01/18179A1) i et testrør, og

35 inkubert ved 26°C i 3 dager med risting. Såkulturen ble

inokulert i 50 ml av medium beskrevet i WO 97/20945 i en egnet beholder, og inkubert ved 26°C i 6 dager ved anvendelse av en rotasjonsrister, hvorefter cellene ble gjenvunnet med sentrifugering. Cellene som ble oppnådd på
5 denne måte ble frosset med nitrogen i væskeform, og deretter knust med en morter og støter. Total RNA ble isolert fra de knuste cellene ved anvendelse av ISOGEN (Nippon Gene) i samsvar med den vedlagte protokoll. Videre ble mRNA rensset fra hel-RNA ved anvendelse av mRNA
10 Purification Kit (Amersham Pharmacia) i samsvar med vedlagte protokoll.

cDNA ble syntetisert fra mRNA ved anvendelse av en Time Saver cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia) i samsvar
15 med vedlagte protokoll. Dette cDNA ble innsatt i en fagvektor, Lambda ZAP II (Stratagene Co.). Den rekombinante fagvektor som ble oppnådd ble underlagt *in vitro*-pakking ved anvendelse av Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene Co.) i samsvar med vedlagte protokoll. Deretter ble *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'-stamme infisert
20 med dette rekombinante fag, og dyrket på en plate for å danne plakk. cDNA-biblioteket som ble konstruert hadde en plakk-dannende enhet på $6,8 \times 10^8$. Videre ble dette cDNA-bibliotek mangfoldiggjort i samsvar med protokoll med
25 følgende Lambda ZAP II. *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'-stamme ble infisert med det rekombinante fag i dette mangfoldiggjorte cDNA-bibliotek og dyrket på en plate for å danne plakk.

30 2. Isolering av partielt DNA-fragment av D-PLDH-gen.

De følgende to primere ble syntetisert basert på sekvensene av peptidfragmentene 1 og 2 oppnådd i Eksempel 1-3.

Primer 1:5'-GTIGTIACRAAICCNGCNAC-3' (SEKV. ID. NR. 5).

Primer 2:5'-GCIGGIGAYTGGGTNAC-3' (SEKV. ID. NR. 6).

5 Ved anvendelse av disse primere ble PCR utført ved å benytte det genomiske DNA isolert fra substansen PF1022-produserende mikroorganisme (FERM BP-2671) som et templat, ved fremgangsmåten beskrevet i WO 01/18179A1. PCR ble utført i 100 µl reaksjonsløsning ved anvendelse av 80 ng genomisk DNA som et templat, og ved tilsetning av 2,5 enheter av ExTaq DNA-polymerase (Takara Shuzo Co., Ltd.), de medfølgende bufferløsninger og dNTP-blanding, og de to typer primere hver med en final konsentrasjon på 0,5 µM, under følgende betingelser: ved 94°C i 5 min. [ved 94°C i 1 min., ved 58°C i 1 min., ved 72°C i 30 sek.] x 40 sykluser, og ved 72°C i 7 min.; lagring ved 4°C. Analyse av reaksjonsløsningen ved hjelp av 2% agarosegel-elektroforese viste at et DNA-fragment på ca. 550 bp ble mangfoldiggjort. Dette DNA-fragment ble gjenvunnet fra agarosegelen ved anvendelse av en kommersiell Sephaglas Band Prep Kit (Amersham Pharmacia). Det gjenvunnede DNA-fragment og pT7Blue T-Vector (Novagen, Inc.) ble ligert ved anvendelse av et DNA Ligation Kit ver. 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.) i samsvar med medfølgende protokoll.

25 Basissekvensen av DNA-fragmentet som ble klonet ble bestemt ved anvendelse av et DNA Sequencing Kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer) og et ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer) i samsvar med medfølgende protokoll. Som et resultat viste basesekvensen seg for det isolerte DNA-fragment å være homolog til det D-α-keto-syre-spesifikke dehydrogenasegen, og var meget sannsynlig en del av D-PLDH-genet av interesse.

35

3. Kloning av hele regionen av cDNA av D-PLDH.

De følgende to primere ble nylig syntetisert basert på sekvensene i DNA-fragmentene oppnådd i Eksempel 2-2.

5

Primer 3: 5'-AAGGGATCCCAGCAGAGCACGATGAA-3'

(SEKV. ID. NR. 7).

Primer 4: 5'-GCAGGCTCGGCTGTAGTTATCAAA-3'

(SEKV. ID. NR. 8).

10

Et PCR-produkt, som ble mangfoldiggjort med PCR med primeren 3 og primer 4 ved anvendelse av DNA-fragmentet oppnådd i Eksempel 2-2 som et templat, ble anvendt som en probe i screening av cDNA-biblioteket. PCR'en ble utført i 15 100 μ l reaksjonsløsning ved anvendelse av 500 ng pT8Blue plasmid vector, hvori DNA-fragmentet oppnådd i Eksempel 2-2 ble innsatt, som et templat, og tilsetning av 2,5 enheter av ExTaq DNA-polymerase (Takara Shuzo Co., Ltd.), den medfølgende bufferløsning og dNTP-blandingen, og de to 20 typer primere hver i en final konsentrasjon på 0,5 μ M, under følgende betingelser: ved 94°C i 5 min., [ved 94°C i 1 min., ved 60°C i 1 min., ved 72°C i 30 sek.] x 40 sykluser, og ved 72°C i 7 min.; lagring ved 4°C. Den resulterende reaksjonsløsning ble underlagt 2% agarosegelelektroforese, 25 som bekreftet nærvær av et DNA-fragment på ca. 530 bp. Dette DNA-fragment ble gjenvunnet fra agarosegelen ved anvendelse av Sephaglas Band Prep Kit (Amersham Pharmacia). Det gjenvunnede DNA-fragment ble merket ved anvendelse av ECL Direct DNA/RNA Labeling Detecting System 30 (Amersham Pharmacia) i samsvar med vedlagte protokoll, og anvendt som en nukleinsyreprobe for hybridisering.

En blotte-membran Hibond N+ (Amersham Pharmacia) ble plassert på platen fremstilt i Eksempel 2-1, hvorpå plakk 35 ble dannet, for å kopiere plakkene. Denne membran ble be-

handlet i samsvar med metoden ifølge Makabe (Kazuhiro Makabe, Visual Experimental Note Series, Biotechnology Experiments Illustrated, 1997, vol 4, i Cell Technology SUpp., pp 125-133, utgitt av Shujunsha) for å immobilisere
5 DNA'en til membranen. I denne behandling ble membranen vasket med 5xSSC. Ved anvendelse av et ECL Direct DNA/RNA Labeling Detecting System (Amersham Pharmacia) ble den merkede nukleinsyreprobe og fag-DNA'en immobilisert på membranen, hybridisert i samsvar med vedlagte protokoll,
10 og deretter ble plakkene hvori den merkede nukleinsyre var hybridisert detektert. På denne måte ble en positiv fag inneholdende en 5'-oppstrømsregion og en 3'-nedstrøms-region homolog til proben selektert.

15 Den positive fag ble behandlet i samsvar med protokollen vedlagt Lambda ZAP II (Stratagene Co.) for å fremstille et plasmid hvori cDNA-genet for D-PLDH var innsatt.

4. Bestemmelse av basesekvens.

20

Sekvensering ble utført ved anvendelse av plasmidet, hvori cDNA-genet for D-PLDH som var isolert, var innsatt, som et templat, og primer 5: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEKV. ID. NR. 9), og/eller primer 6: 5'-AATTAACCTCACTAAAGGG-3'
25 (SEKV. ID. NR. 10) ble benyttet som primere. Sekvenseringen ble utført av et DNA Sequencing Kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer) og et ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer) i samsvar med vedlagte protokoll. Fra de resultatene som ble
30 oppnådd, ble regioner hvor basesekvensene ikke var kjent videre underlagt sekvensering ved anvendelse av primere nylig designert basert på allerede sekvenserte basesekvenser. På denne måte ble basesekvensen for 1509-bp cDNA-genet for D-PLDH innsatt i plasmidet, bestemt.

35

Analysen av denne sekvens viste at en 1011-bp åpen lese-
 ramme (ORF) var til stede. Proteinet ekstrapolert fra
 denne ORF hadde 336 aminosyreenheter og en molekylvekt på
 36,5 kDa, og var homolog til D-melkesyre dehydrogenase,
 5 eller lignende. Den høyeste homologi ble vist med glycerat
 dehydrogenase og homologien var 37%. Basesekvensen og
 aminosyresekvensen av ORF'en for D-PLDH-genet ifølge fore-
 liggende oppfinnelse som således var isolert er vist i
 SEKV. ID. NR. 1 og SEKV. ID. NR. 2 i sekvenslisten,
 10 respektivt.

Eksempel 3: Masseproduksjon av D-PLDH ved masse-
ekspresjon av D-PLDH-genet.

15 1. Fremstilling av D-PLDH-genet for genekspresjon.

PCR ble utført ved anvendelse av plasmidet fremstilt i
 Eksempel 2-3 som et templat, primer 7: 5'-AAGCTTGTAAGGAGA-
 TATACATGGCCCAAGCACAAACA-3' (SEKV. ID. NR. 11) hvortil var
 20 tilsatt et HindIII-sete ved 5'-enden, et stoppkodon rett
 bak, og ytterligere et ribosombindende sete like bak, og
 primer 8: 5'-ATGCAAGCTTTAGTAACCCTATACTTGG-3' (SEKV. ID.
 NR. 12) hvortil kun et HindIII-sete ble tilsatt ved 5'-
 enden, for å mangfoldiggjøre D-PLDH-genet hvori HindIII-
 25 seter ble introdusert til begge ender. PCR'en ble utført i
 20 µl reaksjonsløsning ved anvendelse av 80 ng av plasmid-
 DNA som et templat, 1 enhet TaKaRa LA-Taq DNApolymerase
 (Takara Shuzo Co., Ltd.), den medfølgende bufferløsning og
 dNTP-blanding, 25 mM magnesiumklorid og 100 pM primere,
 30 under de følgende betingelser: ved 94°C i 1 min. [ved 98°C i
 15 sek., ved 68°C i 3 min.] x 30 sykluser, og ved 72°C i 10
 min. Den resulterende reaksjonsløsning ble underlagt 1%
 agarosegelelektroforese for å bekrefte nærvær av et ca.
 100-bp DNA-fragment, som ble gjenvunnet fra agarosegelen
 35 ved anvendelse av et Sephaglas Band Prep Kit (Amersham
 Pharmacia). Det gjenvunnede PCR-produkt og pT7B BlueT-

Vector (Novagen, Inc.) ble ligert ved anvendelse av et DNA Ligation Kit ver. 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.) i samsvar med vedlagte protokoll. Et plasmid ligert med DF-PLDH ble introdusert inn i Escherichia coli DH 5 α og mangfoldiggjort, og plasmid DNA'et ble gjenvunnet ved anvendelse av Concert Rapid Plasmid Purification Systems (Gibco BRL Products).

Gensekvensen for D-PLDH som ble mangfoldiggjort på denne måte ble bekreftet ved anvendelse av primeren avledet fra D-PLDH-genet anvendt i Eksempel 2-4 og en primer avledet fra basesekvensen fra pT7-plasmidvektoren. Sekvensering ble utført ved anvendelse av en DNA Sequencing Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PerkinElmer) og en ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer) i samsvar med vedlagte protokoll.

Etter bekreftelse av sekvensen, ble 24 μ l av en DNAløsning inneholdende pT7-plasmidvektoren hvortil ca. 12 μ g av D-PLDH-genet ble ligert, 3 μ l av HindIII (Toyobo Co., Ltd.), og 3 μ l av den tilhørende bufferløsning grundig blandet, og blandingen ble reagert ved 37°C i 18 timer. Deretter ble reaksjonsløsningen underlagt 1% agarosegelelektroforese for å bekrefte et ca. 1000-bp DNA-fragment. Dette fragment ble gjenvunnet fra agarosegelen ved anvendelse av Sephaglas Band Prep Kit (Amersham Pharmacia) for å oppnå D-PLDH-genet for ekspresjon.

2. Konstruksjon for genekspresjonsvektor.

En løsning inneholdende ca. 2,5 μ g kommersiell pUC119 (Takara Chuzo Co., Ltd.) ble reagert med HindIII (Toyobo Co., Ltd.) og den medfølgende bufferløsning ved 37°C i 18 timer, hvorefter DNA ble gjenvunnet ved fenolekstrahering. Til denne DNA ble det tilsatt 3 μ l alkalisk fosfatase C75

(Takara Shuzo Co., Ltd.), 3 μ l av den vedlagte bufferløsning, og 24 μ l sterilt vann, og deretter ble blandingen reagert ved 50°C i 30 min. for å fjerne den terminale fosforsyre. Det defosforylerte DNA ble gjenvunnet ved fenol-
5 ekstrahering og oppløst i 3 μ l TE-bufferløsning (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8). Plasmid pDPLDH-1 ble konstruert ved å ligere 5 μ l av D-PLDH-gen for ekspresjon fremstilt i Eksempel 3-1 og 0,5 μ l av pUC119-vektoren som ble oppkuttet med HindIII og defosforylert ved termini,
10 ved anvendelse av et DNA Ligation Kit ver. 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.) i samsvar med vedlagte protokoll (Fig. 1).

3. Ekspresjon av D-PLDH i *Escherichia coli*.

15 Celler av *Escherichia coli* DH 5 α (Toyobo Co., Ltd.) hvori dDPLDH-1 ble introdusert, ble spredt på et LB-agar-medium inneholdende 50 μ g/ml ampicillin. Etter dyrkning statisk ved 37°C i 18 timer, ble vokste *E. coli* DH 5 α -celler inokulert i 2 ml LB medium inneholdende 50 μ g/ml
20 ampicillin, og dyrket ved 37°C i 18 timer med risting for å fremstille en såkultur. En andel av såkulturen ble inokulert inn i 2 ml hvert av det samme medium i 10 testrør. Ristekultur ble startet ved 37°C, og etter 5 timer ble IPTG tilsatt til en final konsentrasjon av 1 mM, og ristekulturen fikk fortsette videre i 2 timer. Etter dyrking ble cellene gjenvunnet ved sentrifugering, vasket med bufferløsning A beskrevet i Eksempel 1-2 og deretter suspendert i 2,5 ml av bufferløsning A. Den resulterende suspensjon ble behandlet i en ultrasonikator under iskalde beting-
25 elser, celledetritus ble fjernet ved sentrifugering, og supernatanten, en rå-enzymløsning, ble således oppnådd. *Escherichia coli* DH 5 α som ble transformert ved anvendelse av pUC119 uten D-PLDH-genet ble anvendt som en kontroll.
30

En 150 μl porsjon av bufferløsning A inneholdende 250 μl NADPH og 250 μl fenylpyrodruesyre ble dispensert inn i brønner en 96-brønns mikrotiterplate, 50 μl hver av rå-enzym-løsningen ble tilsatt, og blandet umiddelbart ved anvendelse av en pipette, og en forandring ved absorpsjon ved 340 nm ved 26°C ble målt. Målingene ble utført ved anvendelse av Absorption Microassay Reader BioLumin 960 (Molecular Dynamics) for å spore en nedgang i absorpsjon i forhold til tid etter starten av reaksjonen. Mengden av enzymet som oksiderte 1 μmol av NADPH pr. minutt ble satt til å være 1 enhet. Resultater er vist i Tabell 1 som enzymaktiviteten av rå-enzym-løsningen.

Tabell 1:
Dehydrogenaseaktivitet i rå-enzym-løsning

Stamme fra rå-enzym-løsningen ble fremstilt	Enzymaktivitet
pUC119-bærende stamme	$7,30 \times 10^{-3}$
pDPLDH-1-bærende stamme	$1,01 \times 10^{-1}$

Verdiene som er vist ble omdannet til [enhet/ml rå-enzym-løsning].

Escherichia coli DH5 α transformert med pDPLDH-1 viste således en D-PLDH-aktivitet ca. 13 ganger høyere enn *E. coli* DH5 α transformert med pUC119. Resultatet av analyse ved anvendelse av en optisk delende kolonne bekreftet at produktet av stammen som bærer D-PLDH-genet var D-fenylmelkesyre. Genet i samsvar med foreliggende oppfinnelse ble bekreftet til å være D-PLDH-genet.

Videre ble den oppnådde rå-enzym-løsning prosessert ved anvendelse av MonoQ10/10 under betingelser beskrevet i

Eksempel 1-2 for å fremstille en partielt rensset enzym-
løsning. Denne partielt rensede enzymløsning ble applisert
på en 96-brønns mikrotiter med forskjellige konsentra-
sjoner av substratet, fenylpyrodruesyre, for å måle
5 enzymaktivitet. Videre ble enzymaktiviteten også målt med
et alternativt substrat, pyrodruesyre, i stedet for
fenylpyrodruesyre. Resultater av målingen er vist i Tabell
2, hvor reaksjonshastigheten med pyrodruesyre ble satt til
100.

10

Tabell 2:
Relativ enzymaktivitet med forskjellige
reaksjonssubstrater

15	Reaksjonssubstrat	Relativ reaksjonshastighet (hastighet med fenylpyrodruesyre=100)
	Fenylpyrodruesyre	100
	<u>Pyrodruesyre</u>	<u>10</u>

20

Således ble det bekreftet at enzymet i samsvar med
foreliggende oppfinnelse var klart forskjellig i dets
karakteristika fra kjente melkesyre dehydrogenaser og
lignende (Japanese Patent No 2750017; H. Taguchi, et al.,
25 J. Biol. Chem., (1991) vol 266, p 12588)) og var således
et nytt enzym både med hensyn til aminosyresekvens og
enzymatiske karakteristika.

SEKVENSLISTE

<110> Meiji Seika Kaisha Ltd.

<120> Novel (R)-2-hydroxy-3-phenylpropionate
(D-Phenyllactate) dehydrogenase enzyme and gene encoding
same

<130> 130899PX

<140>

<141>

<150> JP 125449/2000

<151> 2000-04-26

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1011

<212> DNA

<213> Mycelia sterilia

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1008)

<400> 1

atg gcc caa gca caa cca cag acc cat tgg gtt att gtc gca ttg gag	48
Met Ala Gln Ala Gln Pro Gln Thr His Trp Val Ile Val Ala Leu Glu	
1 5 10 15	
act ttc ttc tgt ccg ctc ccc gat ttc act ctc ccg gcg ccg cat acc	96
Thr Phe Phe Cys Pro Leu Pro Asp Phe Thr Leu Pro Ala Pro His Thr	
20 25 30	
tgc gag ttc cgg aac tat gat cgg acg agg cca gac caa ata gcc gag	144
Cys Glu Phe Arg Asn Tyr Asp Arg Thr Arg Pro Asp Gln Ile Ala Glu	
35 40 45	
cga att cgt gat gcc gac atc gtg atc atg aca atc ttg ccg atg ccg	192
Arg Ile Arg Asp Ala Asp Ile Val Ile Met Thr Ile Leu Pro Met Pro	
50 55 60	
gcg gat gtt ctg agc gcg gag gca agc ccg cgc cta aag atg tta tct	240
Ala Asp Val Leu Ser Ala Glu Ala Ser Pro Arg Leu Lys Met Leu Ser	
65 70 75 80	
atc att gct tca ggc acg gac acc gta gac ttg gcg acg tgc cgg gct	288
Ile Ile Ala Ser Gly Thr Asp Thr Val Asp Leu Ala Thr Cys Arg Ala	
85 90 95	
cgg ggg ata gtc gta gcc aac acg ccg cat tgc aat gtc acc acg gtc	336
Arg Gly Ile Val Val Ala Asn Thr Pro His Cys Asn Val Thr Thr Val	
100 105 110	

acc gag cac gta ttc gcg ctc tat ttt gcg aca cgc cgc tcc ata gtg	384
Thr Glu His Val Phe Ala Leu Tyr Phe Ala Thr Arg Arg Ser Ile Val	
115 120 125	
gca aca cat ctg ctc acg cgc gcc ggc gac tgg gtc acc aag gga tcc	432
Ala Thr His Leu Leu Thr Arg Ala Gly Asp Trp Val Thr Lys Gly Ser	
130 135 140	
cag cag agc acg atg aac ggg ccc gac ggg aaa ccg ccg atg aca tgt	480
Gln Gln Ser Thr Met Asn Gly Pro Asp Gly Lys Pro Pro Met Thr Cys	
145 150 155 160	
cgc gac gag ctc gtc ggc atc atc ggc tac ggc gca ata ggg aag aac	528
Arg Asp Glu Leu Val Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Ala Ile Gly Lys Asn	
165 170 175	
gtc gag aca atg gcc aga tca tta ggc atg aaa acc gtc atc gcc ggg	576
Val Glu Thr Met Ala Arg Ser Leu Gly Met Lys Thr Val Ile Ala Gly	
180 185 190	
cac aag ggg gct gcc tcg acg cca gag ggc cgc gcc cca ttc gag acc	624
His Lys Gly Ala Ala Ser Thr Pro Glu Gly Arg Ala Pro Phe Glu Thr	
195 200 205	
gtc atc cgc gag gcc tcg gtc gtc gtg gtc tgt ctc cca cgc tcg ccc	672
Val Ile Arg Glu Ala Ser Val Val Val Val Cys Leu Pro Arg Ser Pro	
210 215 220	
gag aca ttc aac ctc ata tcg gac gct gag ttc gac cag atg aga cag	720

Glu Thr Phe Asn Leu Ile Ser Asp Ala Glu Phe Asp Gln Met Arg Gln
225 230 235 240

tgc ggc ctg ctg atc aac gtg tcg cgc ggc ggc atc gtg gac gag aag 768
Cys Gly Leu Leu Ile Asn Val Ser Arg Gly Gly Ile Val Asp Glu Lys
245 250 255

gcc ctc gtc gct gcg ctg agg gag ggc aag atc gcc ggc gcc ggc aca 816
Ala Leu Val Ala Ala Leu Arg Glu Gly Lys Ile Ala Gly Ala Gly Thr
260 265 270

gat gta tac tcc cag gaa ccg gcc gag ccg aat aac aac gtc ctg ctc 864
Asp Val Tyr Ser Gln Glu Pro Ala Glu Pro Asn Asn Asn Val Leu Leu
275 280 285

gcc gcg gac acg gcg gac ctc aat ctc gtc acg acg ccg cat ctg gcc 912
Ala Ala Asp Thr Ala Asp Leu Asn Leu Val Thr Thr Pro His Leu Ala
290 295 300

tgg tac gcg gag gag acg ttt gat aac tac agc cga gcc tgc agg gcg 960
Trp Tyr Ala Glu Glu Thr Phe Asp Asn Tyr Ser Arg Ala Cys Arg Ala
305 310 315 320

aac gtc gcc ggc ttc gtc acg aca tgc gaa ccc aag tat agg gtt cac 1008
Asn Val Ala Gly Phe Val Thr Thr Ser Glu Pro Lys Tyr Arg Val His
325 330 335

taa 1011

<210> 2

<211> 336

<212> PRT

<213> Mycelia sterilia

<400> 2

Met Ala Gln Ala Gln Pro Gln Thr His Trp Val Ile Val Ala Leu Glu

1

5

10

15

Thr Phe Phe Cys Pro Leu Pro Asp Phe Thr Leu Pro Ala Pro His Thr

20

25

30

Cys Glu Phe Arg Asn Tyr Asp Arg Thr Arg Pro Asp Gln Ile Ala Glu

35

40

45

Arg Ile Arg Asp Ala Asp Ile Val Ile Met Thr Ile Leu Pro Met Pro

50

55

60

Ala Asp Val Leu Ser Ala Glu Ala Ser Pro Arg Leu Lys Met Leu Ser

65

70

75

80

Ile Ile Ala Ser Gly Thr Asp Thr Val Asp Leu Ala Thr Cys Arg Ala

85

90

95

Arg Gly Ile Val Val Ala Asn Thr Pro His Cys Asn Val Thr Thr Val

100

105

110

Thr Glu His Val Phe Ala Leu Tyr Phe Ala Thr Arg Arg Ser Ile Val

115

120

125

Ala Thr His Leu Leu Thr Arg Ala Gly Asp Trp Val Thr Lys Gly Ser
 130 135 140

Gln Gln Ser Thr Met Asn Gly Pro Asp Gly Lys Pro Pro Met Thr Cys
 145 150 155 160

Arg Asp Glu Leu Val Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Ala Ile Gly Lys Asn
 165 170 175

Val Glu Thr Met Ala Arg Ser Leu Gly Met Lys Thr Val Ile Ala Gly
 180 185 190

His Lys Gly Ala Ala Ser Thr Pro Glu Gly Arg Ala Pro Phe Glu Thr
 195 200 205

Val Ile Arg Glu Ala Ser Val Val Val Val Cys Leu Pro Arg Ser Pro
 210 215 220

Glu Thr Phe Asn Leu Ile Ser Asp Ala Glu Phe Asp Gln Met Arg Gln
 225 230 235 240

Cys Gly Leu Leu Ile Asn Val Ser Arg Gly Gly Ile Val Asp Glu Lys
 245 250 255

Ala Leu Val Ala Ala Leu Arg Glu Gly Lys Ile Ala Gly Ala Gly Thr
 260 265 270

Asp Val Tyr Ser Gln Glu Pro Ala Glu Pro Asn Asn Asn Val Leu Leu
 275 280 285

Ala Ala Asp Thr Ala Asp Leu Asn Leu Val Thr Thr Pro His Leu Ala
 290 295 300

Trp Tyr Ala Glu Glu Thr Phe Asp Asn Tyr Ser Arg Ala Cys Arg Ala
 305 310 315 320

Asn Val Ala Gly Phe Val Thr Thr Ser Glu Pro Lys Tyr Arg Val His
 325 330 335

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Mycelia sterilia

<400> 3

Ala Asn Val Ala Gly Phe Val Thr Thr Ser Glu Pro Lys
 1 5 10

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Mycelia sterilia

<400> 4

Ala Gly Asp Trp Val Thr Lys
 1 5

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 1

<400> 5

gtngtnacra anccngcnac

20

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 2

<400> 6

gcnggngayt gggtnac

17

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 3

<400> 7

aagggateccc agcagagcac gatgaa

26

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 4

<400> 8

gcaggctcgg ctgtagttat caaa

24

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 5

<400> 9

taatacgact cactataggg

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 6

<400> 10

aattaaccct cactaaagg

20

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 7

<400> 11

aagcttgtaa ggagatatac atggcccaag cacaacca

38

<210> 12

41

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 8

<400> 12

atgcaagctt tagtgaaccc tatacttgg

29

P A T E N T K R A V.

- 5 1. Protein, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
det omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som
består av følgende sekvenser:
- (a) aminosyresekvensen i SEKV. ID. NR. 2, og
 - 10 (b) en modifisert aminosyresekvens av aminosyresek-
vensen i SEKV. ID. NR. 2 som har én eller flere
modifiseringer valgt fra en substitusjon, en
deletering, en addisjon og et innskudd, og som
har D-fenylmelkesyre dehydrogenaseaktivitet.
- 15 2. Protein, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det
kodes for av en nukleotidsekvens valgt blant gruppen som
består av følgende sekvenser:
- (c) DNA-sekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 1,
 - (d) en nukleotidsekvens som har minst 70% sekvens-
20 identitet med DNA-sekvensen i SEKV. ID. NR. 1,
og som koder for et protein som har D-fenyl
melkesyre dehydrogenaseaktivitet,
 - (f) en nukleotidsekvens som hybridiserer med DNA-
sekvensen i SEKV. ID. NR. 1 under stringente
25 betingelser, og som koder for et protein som har
D-fenylmelkesyre dehydrogenaseaktivitet.
3. Polynukleotid, k a r a k t e r i s e r t v e d
at det koder for proteinet i samsvar med krav 1.
- 30 4. Polynukleotid i samsvar med krav 3, k a r a k -
t e r i s e r t v e d a t det omfatter DNA-sekvensen
ifølge SEKV. ID. NR. 1.

5. Polynukleotidsekvens, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den er valgt fra gruppen som består av de
følgende sekvenser:

- (c) DNA-sekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 1,
- 5 (d) en nukleotidsekvens som har minst 70%
sekvensidentitet med DNA-sekvensen i SEKV. ID. NR. 1, og
som koder for et protein som har D-fenylmelkesyre dehydro-
genaseaktivitet,
- (e) en modifisert DNA-sekvens av DNA-sekvensen i
- 10 SEKV. ID. NR. 1 som har én eller flere modifiseringer
valgt fra en substituert, en deletering, en addisjon og et
innskudd, og som koder for et protein som har D-
fenylmelkesyre dehydrogenaseaktivitet, og
- (f) en nukleotidsekvens som hybridiserer med DNA
- 15 sekvensen i SEKV. ID. NR. 1 under stringente betingelser,
og som koder for et protein som har D-fenylmelkesyre
dehydrogenaseaktivitet.

6. Polynukleotid i samsvar med krav 5, k a r a k -
20 t e r i s e r t v e d at d) er et polynukleotid som
har minst 80% sekvensidentitet med DNA-sekvensen i SEKV.
ID. NR. 1.

7. Polynukleotid i samsvar med krav 5, k a r a k -
25 t e r i s e r t v e d at d) er et polynukleotid som
har minst 90% sekvensidentitet med DNA-sekvensen i SEKV.
ID. NR. 1.

8. Rekombinant vektor, k a r a k t e r i s e r t
30 v e d at den omfatter polynukleotidet ifølge et av
kravene 3-7.

9. Ikke-human vert, k a r a k t e r i s e r t v e d
at den omfatter den rekombinante vektor i krav 8.

10. Vert i samsvar med krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at uttrykker en D-fenylmelkesyre dehydrogenase.
- 5 11. Vert i samsvar med krav 9 eller 10, k a r a k - t e r i s e r t v e d at den er en substans PF1022-produserende mikroorganisme.
- 10 12. Fremgangsmåte for å produsere en D-fenylmelkesyre hydrogenase, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter trinnene å dyrke verten ifølge krav 9, 10 eller 11, og oppta D-fenylmelkesyre dehydrogenase fra dyrkningsmediet.
- 15 13. Fremgangsmåte for å produsere D-fenylmelkesyre, et derivat derav eller en analog derav, k a r a k t e r - i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter trinnene å reagere fenylpyrodruesyre, et derivat derav eller en homolog derav, med proteinet ifølge krav 1, verten ifølge 20 krav 9, 10 eller 11, et ekstrakt av verten, en kultur av verten, eller et enzym rensset fra kulturen, og oppsamle nevnte D-fenylmelkesyre, derivat eller analog.
- 25 14. Fremgangsmåte for å produsere substansen PF1022 eller et derivat derav, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter trinnene å dyrke verten ifølge krav 11 og oppsamle substansen PF1022 eller derivatet derav fra dyrkningsmediet.

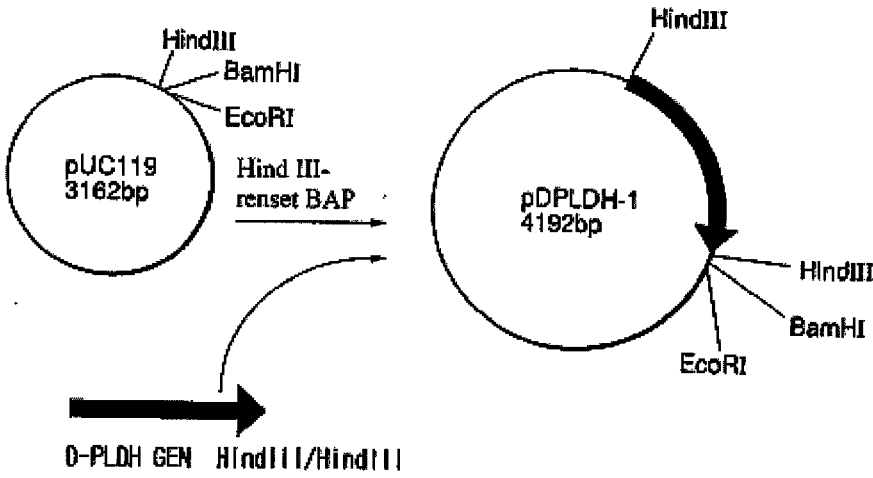


FIG.1
