



(12) PATENT

(19) NO

(11) 327857

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

*CI2N 9/78 (2006.01)*

*CI2N 1/21 (2006.01)*

*CI2N 15/55 (2006.01)*

*CI2P 7/40 (2006.01)*

*CI2P 7/42 (2006.01)*

*CI2P 41/00 (2006.01)*

*CI2R 1/05 (2006.01)*

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	20011912	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.10.13 PCT/EP99/07679
(22)	Inng.dag	2001.04.18	(85)	Videreføringsdag	2001.04.18
(24)	Løpedag	1999.10.13	(30)	Prioritet	1998.10.19, DE, 19848129
(41)	Alm.tilgj	2001.04.18			
(45)	Meddelet	2009.10.05			
(73)	Innehaver	BASF Aktiengesellschaft, Carl-Bosch-Strasse 38, 67056 LUDWIGSHAFEN AM RHEIN, DE			
(72)	Oppfinner	Ralf Mattes, Friedrich-Zundel-Strasse 14, D-70619 Stuttgart, DE Thomas Friedrich, Saalbaustrasse 22-24, D-64283 Darmstadt, DE Bernhard Hauer, Merowingerstrasse 1, 67136 FUSSGÖNHEIM, DE Marion Ress-Löschke, Ringstrasse 3, D-69221 Dossenheim, DE Dirk Engels, Eichenstrasse 13, D-72141 Waldorfhäslach, DE			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO			

---

(54)	Benevnelse	<b>Isolert nukleinsyresekvens kodende for et polypeptid med nitrilaseaktivitet, aminosyresekvens, nukleinsyrekonstruksjon, vektor, mikroorganisme samt fremgangsmåte for fremstilling av chirale karboksylsyrer.</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 0348901 A2, EP 0449648 A2 Kobayashi et al; Proc. Natl. Acad. Sci, vol 90, 1993, s 247-251 Nagasawa et al; Eur. J. Biochem, vol 194, 1991, s 765-772			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen angår nukleinsyresekvenser som koder for et polypeptid som har nitrilaseaktivitet, nukleinsyrekonstruksjoner omfattende nukleinsyresekvensene og vektorer omfattende nukleinsyresekvensene eller nukleinsyrekonstruksjonene. Oppfinnelsen angår videre aminosyresekvenser som er kodet for av nukleinsyresekvensene og mikroorganismer omfattende nukleinsyresekvensene, nukleinsyrekonstruksjonene eller vektorer omfattende nukleinsyresekvensene eller nukleinsyrekonstruksjonene. Oppfinnelsen angår i tillegg en fremgangsmåte for fremstilling av chirale karboksylsyrer fra de racemiske nitriler.

Foreliggende oppfinnelse vedrører isolert nukleinsyresekvens kodende for et polypeptid med nitrilase aktivitet, aminosyresekvens, nukleinsyrekonstruksjon, vektor, mikroorganisme samt fremgangsmåte for fremstilling av chirale karboksylsyrer.

5

### Beskrivelse

Chirale karboksylsyrer er forbindelser som er etterspurt for organisk kjemisk syntese. De er utgangsmaterialer for et stort antall av farmasøytisk aktive virkestoffer eller aktive virkestoffer for avlingsbeskyttelse. Chirale karboksylsyrer kan anvendes for klassisk racematspaltning via diastereomere salter. Således blir R-(-)- eller S-(-)-mandelsyre anvendt for eksempel for racematspaltning av racemiske aminer. R-(-)-mandelsyre blir i tillegg anvendt som mellomprodukt for syntetisering av semisyntetiske antibiotika og et stort antall av landbruksprodukter.

Mange forskjellige synteseveier til chirale karboksylsyrer er beskrevet i litteraturen. Således blir for eksempel optisk aktive aminosyrer oppnådd industrielt ved fermenteringsprosesser. Disse har ulempen at en spesifikk prosess må utvikles for hver aminosyre. Dette er fordi kjemiske eller enzymatiske prosesser blir anvendt for å kunne fremstille et maksimalt bredt område av forskjellige forbindelser. En ulempe med kjemiske prosesser er at stereosenteret vanligvis må konstrueres i kompliserte, multitrinn, ikke bredt anvendelige synteser.

Enzymatisk syntese av chirale karboksylsyrer kan finnes i flere patenter eller patentsøknader. WO92/05275 beskriver syntese av enantiomere  $\alpha$ -hydroksey- $\alpha$ -alkyl- eller  $\alpha$ -alkylkarboksylsyrer i nærvær av biologiske materialer. EP-B-0 348 901 krever en fremgangsmåte for fremstilling av optisk aktive  $\alpha$ -substituerte organiske syrer ved anvendelse av mikroorganismer av slektene *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Corynebacterium* sp. stamme KO-2-4, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* og *Candida*. Fremstilling av L- $\alpha$ -aminosyrer ved anvendelse av mikroorganismer er krevet i EP-B-0 332 379.

Kobayashi et al; Proc. Natl. Acad. Sci. fol 90, 1993, p. 247-251 beskriver kloning og sekvensering av en nitrilase fra *Alcaligenes faecalis* SM3.

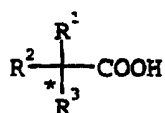
Fremstilling av  $\alpha$ -hydroksykarboksylysyre, spesifikt fremstilling av optisk aktiv melkesyre eller mandelsyre, ved anvendelse av forskjellige mikroorganismer, så som mikroorganismer av slektene *Alcaligenes*, *Aureobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Caseobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, *Variovorax*, *Arthrobacter* og *Candida* eller ved anvendelse av enzymer er beskrevet i patentene EP-A-0 348 901 eller dens US ekvivalent US 5,283,193, EP-A-0 449 648, EP-B-0 473 328, EP-B-0 527 553 eller dens US ekvivalent US 5,296,373, EP-A-0 610 048, EP-A-0 610 049, EP-A 0 666 320 eller WO97/32030.

Ulempene med disse prosesser er at de ofte fører til produkter med bare liten optisk renhet og/eller at de forløper med bare små rom-tid utbytter. Dette fører til økonomisk uattraktive prosesser. Selv forsøk på å øke produktivitet ved tilsetning av substanser så som sulfitt, disulfitt, ditionitt, hypofosfitt eller fosfitt (se EP-A 0 486 289) eller ved anvendelse av mikroorganismer som har en øket resistens mot  $\alpha$ -hydroksynitriler (se WO97/32030) fører til en neglisjerbar økning i produktivitet.

Det er et formål med foreliggende oppfinnelse å utvikle en lett, kostnadseffektiv, utstrakt anvendelig fremgangsmåte for fremstilling av optisk aktive chirale karboksylysyre som ikke har de ovennevnte ulemper.

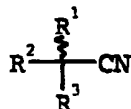
Vi har funnet at dette målet blir oppnådd ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for fremstilling av chirale karboksylysyre med den generelle formel I

25



(I)

som omfatter omdannelse av racemiske nitriler med den generelle formel II



(II)

i nærvær av en aminosyresekvens ifølge krav 2 eller 3 eller en voksende, sovende eller splittet mikroorganisme ifølge krav 6 eller 7 og hvor minst 25 mmol nitril blir omdannet pr. time og pr. mg protein eller 25 mmol nitril blir omdannet pr. time og pr. g tørrvekt, til de chirale karboksylsyrer,

hvor substituentene og variablene i formlene I og II har de følgende betydninger:

\* et optisk aktivt senter

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  uavhengig av hverandre hydrogen, substituert eller usubstituert, forgrenet eller uforgrenet  $C_1$ - $C_{10}$ -alkyl,  $C_2$ - $C_{10}$ -alkenyl, substituert eller usubstituert aryl, hetaryl,  $OR^4$  eller  $NR^4R^5$  og hvor restene  $R^1$ ,  $R^2$  og  $R^3$  alltid er forskjellige,

$R^4$  hydrogen, substituert eller usubstituert, forgrenet eller uforgrenet  $C_1$ - $C_{10}$ -alkyl,  $C_2$ - $C_{10}$ -alkenyl,  $C_1$ - $C_{10}$ -alkylkarbonyl,  $C_2$ - $C_{10}$ -alkenylkarbonyl, aryl, arylkarbonyl, hetaryl eller hetarylkarbonyl,

$R^5$  hydrogen, substituert eller usubstituert, forgrenet eller uforgrenet  $C_1$ - $C_{10}$ -alkyl,  $C_2$ - $C_{10}$ -alkenyl, aryl eller hetaryl.

Alkylrester som kan nevnes er substituerte eller usubstituerte, forgrenede eller uforgrenede  $C_1$ - $C_{10}$ -alkylkjeder så som for eksempel metyl, etyl, n-propyl, 1-metyletyl, n-butyl, 1-metylpropyl, 2-metylpropyl, 1,1-dimetyletyl, n-pentyl, 1-metylbutyl, 2-metylbutyl, 3-metylbutyl, 2,2-dimetylpropyl, 1-etylpropyl, n-heksyl, 1,1-dimetylpropyl, 1,2-dimetylpropyl, 1-metylpentyl, 2-metylpentyl, 3-metylpentyl, 4-metylpentyl, 1,1-dimetylbutyl, 1,2-dimetylbutyl, 1,3-dimetylbutyl, 2,2-dimetylbutyl, 2,3-dimetylbutyl, 3,3-dimetylbutyl, 1-etylbutyl, 2-etylbutyl, 1,1,2-trimetylpropyl, 1,2,2-trimetylpropyl, 1-etyl-1-metylpropyl, 1-etyl-2-metylpropyl, n-

heptyl, n-oktyl, n-nonyl eller n-decyl. Metyl, etyl, n-propyl, n-butyl, i-propyl eller i-butyl er foretrukket.

Alkenylrester som kan nevnes er forgrenede eller uforgrenede C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-alkenylkjeder så som for eksempel etenyl, propenyl, 1-butenyl, 2-butenyl, 3-butenyl, 2-metylpropenyl, 1-pentenyl, 2-pentenyl, 3-pentenyl, 4-pentenyl, 1-metyl-1-butenyl, 2-metyl-1-butenyl, 3-metyl-1-butenyl, 1-metyl-2-butenyl, 2-metyl-2-butenyl, 3-metyl-2-butenyl, 1-metyl-3-butenyl, 2-metyl-3-butenyl, 3-metyl-3-butenyl, 1,1-dimetyl-2-propenyl, 1,2-dimetyl-1-propenyl, 1,2-dimetyl-2-propenyl, 1-etyl-1-propenyl, 1-etyl-2-propenyl, 1-heksenyl, 2-heksenyl, 3-heksenyl, 4-heksenyl, 5-heksenyl, 1-metyl-1-pentenyl, 2-metyl-1-pentenyl, 3-metyl-1-pentenyl, 4-metyl-1-pentenyl, 1-metyl-2-pentenyl, 2-metyl-2-pentenyl, 3-metyl-2-pentenyl, 4-metyl-2-pentenyl, 1-metyl-3-pentenyl, 2-metyl-3-pentenyl, 3-metyl-3-pentenyl, 4-metyl-3-pentenyl, 1-metyl-4-pentenyl, 2-metyl-4-pentenyl, 3-metyl-4-pentenyl, 4-metyl-4-pentenyl, 1,1-dimetyl-2-butenyl, 1,1-dimetyl-3-butenyl, 1,2-dimetyl-1-butenyl, 1,2-dimetyl-2-butenyl, 1,2-dimetyl-3-butenyl, 1,3-dimetyl-1-butenyl, 1,3-dimetyl-2-butenyl, 1,3-dimetyl-3-butenyl, 2,2-dimetyl-3-butenyl, 2,3-dimetyl-1-butenyl, 2,3-dimetyl-2-butenyl, 2,3-dimetyl-3-butenyl, 3,3-dimetyl-1-butenyl, 3,3-dimetyl-2-butenyl, 1-etyl-1-butenyl, 1-etyl-2-butenyl, 1-etyl-3-butenyl, 2-etyl-1-butenyl, 2-etyl-2-butenyl, 2-etyl-3-butenyl, 1,1,2-trimetyl-2-propenyl, 1-etyl-1-metyl-2-propenyl, 1-etyl-2-metyl-1-propenyl, 1-etyl-2-metyl-2-propenyl, 1-heptenyl, 2-heptenyl, 3-heptenyl, 4-heptenyl, 5-heptenyl, 6-heptenyl, 1-oktenyl, 2-oktenyl, 3-oktenyl, 4-oktenyl, 5-oktenyl, 6-oktenyl, 7-oktenyl, nonenyl eller decenyl. Etenyl, propenyl, butenyl eller pentenyl er foretrukket.

Arylrester som kan nevnes er substituerte og usubstituerte arylrester som inneholder 6 til 20 karbonatomer i ringen eller ringsystemet. Det sistnevnte kan omfatte aromatiske ringer som er kondensert sammen eller aromatiske ringer bundet med alkyl-, alkylkarbonyl-, alkenyl- eller alkenylkarbonyl-kjeder, karbonyl, oksygen eller nitrogen. Arylestene kan eventuelt også være bundet via en C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-alkenyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alkynyl- eller C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-cykloalkyl-kjede til det basiske rammeverket. Fenyl eller naftyl er foretrukket.

Hetarylrester som kan nevnes er substituerte eller usubstituerte, enkle eller kondenserte aromatiske ringsystemer med én eller flere heteroaromatiske 3-til 7-leddede ringer som kan inneholde ett eller flere heteroatomer så som N, O

eller S og kan, eventuelt, være bundet via en C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-alkenyl- eller C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-cykloalkyl-kjede til det basiske rammeverket. Eksempler på hetarylrester av denne typen er pyrazol, imidazol, oksazol, isoksazol, tiazol, triazol, pyridin, kinolin, isokinolin, akridin, pyrimidin, pyridazin, pyrazin, fenazin, purin eller pteridin. Hetarylrestene kan være bundet til det basiske rammeverket via heteroatomer eller via de forskjellige karbonatomer i ringen eller ringsystemet eller via substituentene. Pyridin, imidazol, pyrimidin, purin, pyrazin eller kinolin er foretrukket.

Egnede substituenten for nevnte R<sup>1</sup>-, R<sup>2</sup>- eller R<sup>3</sup>-rester er for eksempel én eller flere substituenten så som halogen så som fluor, klor eller brom, merkaptog, nitro, amino, hydroksyl, alkyl, alkoksy, alkenyl, alkenyloksy, alkynyl eller andre aromatiske eller andre mettede eller umettede ikke-aromatiske ringer eller ringsystemer. Det er foretrukket alkylrester så som C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alkyl så som metyl, etyl, propyl eller butyl, aryl så som fenyl, halogen så som klor, fluor eller brom, hydroksyl eller amino.

R<sup>4</sup> i OR<sup>4</sup>- eller NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>-restene er hydrogen, substituert eller usubstituert, forgrenet eller uforgrenet C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-alkyl, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-alkenyl, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-alkylkarbonyl, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-alkenylkarbonyl, aryl, arylkarbonyl, hetaryl eller hetarylkarbonyl.

Alkylrester som kan nevnes er substituerte eller usubstituerte, forgrenede eller uforgrenede C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-alkylkjeder så som for eksempel metyl, etyl, n-propyl, 1-metyletyl, n-butyl, 1-metylpropyl, 2-metylpropyl, 1,1-dimetyletyl, n-pentyl, 1-metylbutyl, 2-metylbutyl, 3-metylbutyl, 2,2-dimetylpropyl, 1-etylpropyl, n-heksyl, 1,1-dimetylpropyl, 1,2-dimetylpropyl, 1-metylpentyl, 2-metylpentyl, 3-metylpentyl, 4-metylpentyl, 1,1-dimetylbutyl, 1,2-dimetylbutyl, 1,3-dimetylbutyl, 2,2-dimetylbutyl, 2,3-dimetylbutyl, 3,3-dimetylbutyl, 1-etylbutyl, 2-etylbutyl, 1,1,2-trimetylpropyl, 1,2,2-trimetylpropyl, 1-etyl-1-metylpropyl, 1-etyl-2-metylpropyl, n-heptyl, n-oktyl, n-nonyl eller n-decyl. Metyl, etyl, n-propyl, n-butyl, i-propyl eller i-butyl er foretrukket.

Alkenylrester som kan nevnes er forgrenede eller uforgrenede C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-alkenyl-kjeder så som for eksempel etenyl, propenyl, 1-butenyl, 2-butenyl, 3-butenyl, 2-metylpropenyl, 1-pentenyl, 2-pentenyl, 3-pentenyl, 4-pentenyl, 1-metyl-1-butenyl, 2-metyl-1-butenyl, 3-metyl-1-butenyl, 1-metyl-2-butenyl, 2-metyl-2-butenyl, 3-metyl-2-butenyl, 1-metyl-3-butenyl, 2-metyl-3-butenyl, 3-metyl-3-

butenyl, 1,1-dimetyl-2-propenyl, 1,2-dimetyl-1-propenyl, 1,2-dimetyl-2-propenyl, 1-etyl-1-propenyl, 1-etyl-2-propenyl, 1-heksenyl, 2-heksenyl, 3-heksenyl, 4-heksenyl, 5-heksenyl, 1-metyl-1-pentenyl, 2-metyl-1-pentenyl, 3-metyl-1-pentenyl, 4-metyl-1-pentenyl, 1-metyl-2-pentenyl, 2-metyl-2-pentenyl, 3-metyl-2-pentenyl, 4-metyl-2-pentenyl, 1-metyl-3-pentenyl, 2-Metyl-3-pentenyl, 3-metyl-3-pentenyl, 4-metyl-3-pentenyl, 1-metyl-4-pentenyl, 2-metyl-4-pentenyl, 3-metyl-4-pentenyl, 4-metyl-4-pentenyl, 1,1-dimetyl-2-butenyl, 1,1-dimetyl-3-butenyl, 1,2-dimetyl-1-butenyl, 1,2-dimetyl-2-butenyl, 1,2-dimetyl-3-butenyl, 1,3-dimetyl-1-butenyl, 1,3-dimetyl-2-butenyl, 1,3-dimetyl-3-butenyl, 2,2-dimetyl-3-butenyl, 2,3-dimetyl-1-butenyl, 2,3-dimetyl-2-butenyl, 2,3-dimetyl-3-butenyl, 3,3-dimetyl-1-butenyl, 3,3-dimetyl-2-butenyl, 1-etyl-1-butenyl, 1-etyl-2-butenyl, 1-etyl-3-butenyl, 2-etyl-1-butenyl, 2-etyl-2-butenyl, 2-etyl-3-butenyl, 1,1,2-trimetyl-2-propenyl, 1-etyl-1-metyl-2-propenyl, 1-etyl-2-metyl-1-propenyl, 1-etyl-2-metyl-2-propenyl, 1-heptenyl, 2-heptenyl, 3-heptenyl, 4-heptenyl, 5-heptenyl, 6-heptenyl, 1-oktenyl, 2-oktenyl, 3-oktenyl, 4-oktenyl, 5-oktenyl, 6-oktenyl, 7-oktenyl, nonenyl eller decenyl. Etenyl, propenyl, butenyl eller pentenyl er foretrukket.

Alkylkarbonylrester som kan nevnes er substituerte eller usubstituerte, forgrenede eller uforgrenede C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-alkylkarbonyl-kjeder så som for eksempel metylkarbonyl, etylkarbonyl, n-propylkarbonyl, 1-metyletylkarbonyl, n-butylkarbonyl, 1-metylpropylkarbonyl, 2-metylpropylkarbonyl, 1,1-dimetyletylkarbonyl, n-pentylkarbonyl, 1-metylbutylkarbonyl, 2-metylbutylkarbonyl, 3-metylbutylkarbonyl, 2,2-dimetylpropylkarbonyl, 1-etylpropylkarbonyl, n-heksylkarbonyl, 1,1-dimetylpropylkarbonyl, 1,2-dimetylpropylkarbonyl, 1-metylpentylkarbonyl, 2-metylpentylkarbonyl, 3-metylpentylkarbonyl, 4-metylpentylkarbonyl, 1,1-dimetylbutylkarbonyl, 1,2-dimetylbutylkarbonyl, 1,3-dimetylbutylkarbonyl, 2,2-dimetylbutylkarbonyl, 2,3-dimetylbutylkarbonyl, 3,3-dimetylbutylkarbonyl, 1-etylbutylkarbonyl, 2-etylbutylkarbonyl, 1,1,2-trimetylpropylkarbonyl, 1,2,2-trimetylpropylkarbonyl, 1-etyl-1-metylpropylkarbonyl, 1-etyl-2-metylpropylkarbonyl, n-heptylkarbonyl, n-oktylkarbonyl, n-nonylkarbonyl eller n-decylkarbonyl. Metylkarbonyl, etylkarbonyl, n-propylkarbonyl, n-butylkarbonyl, i-propylkarbonyl eller i-butylkarbonyl er foretrukket.

Alkenylkarbonylrester som kan nevnes er forgrenede eller uforgrenede C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-alkenylkarbonylkjeder så som for eksempel etenylkarbonyl, propenylkarbonyl,

1-butenylkarbonyl, 2-butenylkarbonyl, 3-butenylkarbonyl, 2-  
 metylpropenylkarbonyl, 1-pentenylkarbonyl, 2-pentenylkarbonyl, 3-  
 pentenylkarbonyl, 4-pentenylkarbonyl, 1-metyl-1-butenylkarbonyl, 2-metyl-1-  
 butenylkarbonyl, 3-metyl-1-butenylkarbonyl, 1-metyl-2-butenylkarbonyl, 2-metyl-  
 2-butenylkarbonyl, 3-metyl-2-butenylkarbonyl, 1-metyl-3-butenylkarbonyl, 2-  
 metyl-3-butenylkarbonyl, 3-metyl-3-butenylkarbonyl, 1,1-dimetyl-2-  
 propenylkarbonyl, 1,2-dimetyl-1-propenylkarbonyl, 1,2-dimetyl-2-  
 propenylkarbonyl, 1-etyl-1-propenylkarbonyl, 1-etyl-2-propenylkarbonyl, 1-  
 heksenylkarbonyl, 2-heksenylkarbonyl, 3-heksenylkarbonyl, 4-heksenylkarbonyl,  
 5-heksenylkarbonyl, 1-metyl-1-pentenylkarbonyl, 2-metyl-1-pentenylkarbonyl, 3-  
 metyl-1-pentenylkarbonyl, 4-metyl-1-pentenylkarbonyl, 1-metyl-2-  
 pentenylkarbonyl, 2-metyl-2-pentenylkarbonyl, 3-metyl-2-pentenylkarbonyl, 4-  
 metyl-2-pentenylkarbonyl, 1-metyl-3-pentenylkarbonyl, 2-metyl-3-  
 pentenylkarbonyl, 3-metyl-3-pentenylkarbonyl, 4-metyl-3-pentenylkarbonyl, 1-  
 metyl-4-pentenylkarbonyl, 2-metyl-4-pentenylkarbonyl, 3-metyl-4-  
 pentenylkarbonyl, 4-metyl-4-pentenylkarbonyl, 1,1-dimetyl-2-butenylkarbonyl, 1,1-  
 dimetyl-3-butenylkarbonyl, 1,2-dimetyl-1-butenylkarbonyl, 1,2-dimetyl-2-  
 butenylkarbonyl, 1,2-dimetyl-3-butenylkarbonyl, 1,3-dimetyl-1-butenylkarbonyl,  
 1,3-dimetyl-2-butenylkarbonyl, 1,3-dimetyl-3-butenylkarbonyl, 2,2-dimetyl-3-  
 butenylkarbonyl, 2,3-dimetyl-1-butenylkarbonyl, 2,3-dimetyl-2-butenylkarbonyl,  
 2,3-dimetyl-3-butenylkarbonyl, 3,3-dimetyl-1-butenylkarbonyl, 3,3-dimetyl-2-  
 butenylkarbonyl, 1-etyl-1-butenylkarbonyl, 1-etyl-2-butenylkarbonyl, 1-etyl-  
 3-butenylkarbonyl, 2-etyl-1-butenylkarbonyl, 2-etyl-2-butenylkarbonyl, 2-etyl-3-  
 butenylkarbonyl, 1,1,2-trimetyl-2-propenylkarbonyl, 1-etyl-1-metyl-2-  
 propenylkarbonyl, 1-etyl-2-metyl-1-propenylkarbonyl, 1-etyl-2-metyl-2-  
 propenylkarbonyl, 1-heptenylkarbonyl, 2-heptenylkarbonyl, 3-heptenylkarbonyl, 4-  
 heptenylkarbonyl, 5-heptenylkarbonyl, 6-heptenylkarbonyl, 1-oktenylkarbonyl, 2-  
 oktenylkarbonyl, 3-oktenylkarbonyl, 4-oktenylkarbonyl, 5-oktenylkarbonyl, 6-  
 oktenylkarbonyl, 7-oktenylkarbonyl, nonenylkarbonyl eller decenylkarbonyl.  
 Etenylkarbonyl, propenylkarbonyl, butenylkarbonyl eller pentenylkarbonyl er  
 foretrukket.

Arylrester som kan nevnes er substituerte og usubstituerte arylrester som  
 inneholder 6 til 20 karbonatomer i ringen eller ringsystemet. Det sistnevnte kan



omfatte aromatiske ringer som er kondensert sammen eller aromatiske ringer som er bundet via alkyl-, alkylkarbonyl-, alkenyl- eller alkenylkarbonyl-kjeder, karbonyl, oksygen eller nitrogen. Arylrestene kan eventuelt også være bundet via en C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-alkenyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alkynyl- eller C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-cykloalkyl-kjede til det 5 basiske rammeverket. Fenyl eller naftyl er foretrukket.

Arylkarbonylrester som kan nevnes er substituerte og usubstituerte arylkarbonylrester som inneholder 6 til 20 karbonatomer i ringen eller ringsystemet. Det sistnevnte kan omfatte aromatiske ringer som er kondensert sammen eller aromatiske ringer som er bundet via alkyl-, alkylkarbonyl-, alkenyl- eller alkenylkarbonyl-kjeder, karbonyl, oksygen eller nitrogen. Fenylkarbonyl eller 10 naftylkarbonyl er foretrukket.

Hetarylrester som kan nevnes er substituerte eller usubstituerte, enkle eller kondenserte aromatiske ringsystemer med én eller flere heteroaromatiske 3- til 7-leddede ringer som kan inneholde ett eller flere heteroatomer så som N, O eller S og kan, eventuelt, være bundet via en C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-alkenyl- eller C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-cykloalkyl-kjede til det basiske rammeverket. Eksempler på hetarylrester av denne typen er pyrazol, imidazol, oksazol, isoksazol, tiazol, triazol, pyridin, kinolin, isokinolin, acridin, pyrimidin, pyridazin, pyrazin, fenazin, purin eller pteridin. Hetarylrestene kan være bundet til det basiske rammeverket via 20 heteroatomene eller via de forskjellige karbonatomer i ringen eller ringsystemet eller via substituentene. Hetarylkarbonylrester betyr heteroaromatiske rester som er bundet via en karbonylrest til det basiske rammeverket. Pyridin, imidazol, pyrimidin, purin, pyrazin eller kinolin er foretrukket.

Egnede substituenten for nevnte R<sup>4</sup>-rester er for eksempel én eller flere 25 substituenten så som halogen så som fluor, klor eller brom, merkapto, nitro, amino, hydroksyl, alkyl, alkoksy, alkenyl, alkenyloksy, alkynyl eller andre aromatiske eller andre mettede eller umettede ikke-aromatiske ringer eller ringsystemer. Det er foretrukket alkylrester så som C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alkyl så som metyl, etyl, propyl eller butyl, halogen så som klor, fluor eller brom, hydroksyl eller 30 amino.

Resten R<sup>4</sup> er fortrinnsvis hydrogen.

R<sup>5</sup> i resten NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> er hydrogen, substituert eller usubstituert, forgrenet eller uforgrenet C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-alkyl, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-alkenyl, aryl eller hetaryl, hvor alkyl-, alkenyl-,

aryl- og hetaryl-restene har de ovennevnte betydninger. Det er foretrukket hydrogen eller C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-alkyl så som metyl, etyl eller propyl.

Egnede substituenten for nevnte R<sup>5</sup>- rester er for eksempel én eller flere substituenten så som halogen så som fluor, klor eller brom, merkaptog, nitro, amino, hydroksyl, alkyl, alkoksy, alkenyl, alkenyloksy, alkynyl eller andre aromatiske eller andre mettede eller umettede ikke-aromatiske ringer eller ringsystemer. Det er foretrukket alkylrester så som C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alkyl så som metyl, etyl, propyl eller butyl, aryl så som fenyl, halogen så som klor, fluor eller brom, hydroksyl eller amino.

Det er videre mulig for to nabostilte R<sup>4</sup>- eller R<sup>5</sup>- substituenten sammen å danne en annen substituert eller usubstituert aromatisk, mettet eller delvis mettet ring med 5 til 6 atomer i ringen som kan inneholde ett eller flere heteroatomer så som O, N eller S.

Det er fordelaktig at én av R<sup>1</sup>-, R<sup>2</sup>- eller R<sup>3</sup>-substituentene i formlene I og II er aryl, så som fenyl. Det er videre foretrukket at én av R<sup>1</sup>-, R<sup>2</sup>- eller R<sup>3</sup>- substituentene i formlene I og II er hydroksyl og én er hydrogen eller metyl.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen blir fordelaktig utført ved en pH på fra 4 til 11, fortrinnsvis fra 4 til 9.

Det er videre fordelaktig å anvende fra 0,01 til 10 vekt% av nitril eller 0,01 til 10 vekt% av et tilsvarende aldehyd eller keton og 0,01 til 10 vekt% av hydrocyanisyre ved fremgangsmåten. Fremgangsmåten blir fordelaktig utført med et overskudd av hydrocyanisyre. Under noen omstendigheter fører dette til hydrocyanisyre-innhold som er høyere enn de angitte. Forskjellige mengder av nitril kan anvendes i reaksjonen, avhengig av nitrilet. De minste mengder (= mengder mellom 0,01 og 5 vekt%) nitril blir fordelaktig anvendt for nitriler (cyanohydriner) som er i likevekt med de tilsvarende aldehyder og hydrocyanisyre, siden aldehydet vanligvis er toksisk for mikroorganismene eller enzymene. Flyktige nitriler blir likeledes fordelaktig anvendt i mengder mellom 0,01 og 5 vekt%. Reaksjonen blir sinket med større mengder av cyanohydrin eller nitril. I tilfellet av nitriler som har bare dårlige eller praktisk talt ingen løsningsmiddel-egenskaper eller nitriler som oppløses i bare meget små mengder i vandig medium, er det mulig og fordelaktig å anvende større mengder enn de angitt ovenfor. For å øke omdannelsen og utbyttet, blir reaksjonen fordelaktig

utført med kontinuerlig tilsetning av det racemiske nitril. Produktet kan isoleres etter slutten av reaksjonen eller ellers fjernes kontinuerlig ved en omføring.

De ovennevnte passende aldehyder eller ketoner betyr forbindelser som danner nitrilet etter reaksjon mellom aldehydet eller ketonet og hydrocyansyre, eventuelt med syrekatalyse. Reaksjonen mellom aldehyd og hydrocyansyre resulterer i cyanohydriner som har fordelene at de er i likevekt med aldehyd og hydrocyansyre. Oppsetting av en likevekt med cyanohydrinet betyr at det er mulig med et enzym som omdanner bare én enantiomer av nitrilet og likevel oppnår et utbytte på 100% av teoretisk fordi det racemiske nitril blir kontinuerlig etterfylt. Med alle andre nitriler, blir det enzymatisk ikke-omdannede nitrilet (= "feil" eller andre enantiomer) fordelaktig racemisert ved en kjemisk reaksjon og returnert til prosessen for å kunne nå et teoretisk utbytte på 100% eller blir kastet eller renses og kjemisk hydrolysert med retensjon av stereosenteret.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen blir fordelaktig utført ved en temperatur mellom 0°C og 80°C, fortrinnsvis mellom 10°C og 60°C, spesielt foretrukket mellom 15°C og 50°C.

Racemiske nitriler ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen betyr nitriler som består av en 50:50 blanding av de to enantiomerer eller av hvilken som helst annen blanding med anrikning av én av de to enantiomerer i blandingen.

Chirale karboksylsyrer ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen betyr de som viser en enantiomer anrikning. Fremgangsmåten resulterer fortrinnsvis i enantiomer renhet på minst 90%ee, fortrinnsvis minst 95%ee, spesielt fortrinnsvis minst 98%ee, og meget spesielt foretrukket minst 99 %ee.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen gjør det mulig å omdanne et stort antall av racemiske nitriler til de chirale karboksylsyrer. Det er mulig ved fremgangsmåten å omdanne minst 25 mmol nitril/time x mg protein eller minst 25 mmol nitril/time x g tørrvekt av mikroorganismene, fortrinnsvis minst 30 mmol nitril/time x mg protein eller minst 30 mmol nitril/time x g tørrvekt, spesielt fortrinnsvis minst 40 mmol nitril/time x mg protein eller minst 40 mmol nitril/time x g tørrvekt, meget spesielt foretrukket minst 50 mmol nitril/time x mg protein eller minst 50 mmol nitril/time x g tørrvekt.

Det kan anvendes voksende celler som omfatter nukleinsyrene, nukleinsyrekonstruksjonene eller vektorene ifølge oppfinnelsen for

fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Sovende eller splittede celler kan også anvendes. Splittede celler betyr for eksempel celler som er gjort permeable ved behandling med for eksempel løsningsmidler eller celler som er oppløst ved enzymbehandling, ved mekanisk behandling (f.eks. French-presse eller ultralyd) eller ved hvilken som helst annen metode. De rå ekstrakter oppnådd på denne måten er egnede og fordelaktige for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Rensede eller delvis rensede enzymer kan også anvendes for fremgangsmåten. Immobiliserte mikroorganismer eller enzymer er likeledes egnet og kan fordelaktig anvendes i reaksjonen.

De chirale karboksylsyrer fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan fordelaktig isoleres fra den vandige reaksjonsløsning ved ekstraksjon eller krystallisering eller ved ekstraksjon og krystallisering. For dette formål blir den vandige reaksjonsløsning surgjort med en syre så som en mineralsyre (f.eks. HCl eller H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) eller en organisk syre, fordelaktig til pH-verdier under 2 og deretter ekstrahert med et organisk løsningsmiddel. Ekstraksjonen kan gjentas mange ganger for å øke utbyttet. Organiske løsningsmidler som kan anvendes er i prinsippet alle løsningsmidler som har et faseskille mot vann, eventuelt etter tilsetning av salter. Fordelaktige løsningsmidler er løsningsmidler så som toluen, benzen, heksan, metyl-tert-butyleter eller etylacetat.

Etter konsentrasjon av den organiske fasen kan produktene vanligvis isoleres med god kjemisk renhet, hvilket betyr en kjemisk renhet over 90%. Etter ekstraksjon kan den organiske fasen med produktet imidlertid også bare delvis konsentreres og produktet krystalliseres. For dette formålet blir løsningen fordelaktig avkjølt til en temperatur på fra 0°C til 10°C. Krystalliseringen kan også skje direkte fra den organiske løsningen. Det krystalliserte produktet kan opptas igjen i samme eller et forskjellig løsningsmiddel for ny krystallisering og krystalliseres én gang til. Den påfølgende krystallisering minst én gang kan, avhengig av stillingen av det eutektiske preparatet, ytterligere øke den enantiomere renhet av produktet.

De chirale karboksylsyrer kan imidlertid også krystalliseres ut fra den vandige reaksjonsløsningen umiddelbart etter surgjøring med en syre til en pH fordelaktig under 2. Dette medfører at den vandige løsningen fordelaktig blir

konsentrert ved oppvarming for å redusere dens volum med 10 til 90%,  
fortrinnsvis 20 til 80%, spesielt fortrinnsvis 30 til 70%. Krystalliseringen blir  
fortrinnsvis utført ved avkjøling. Temperaturer mellom 0°C og 10°C er foretrukket  
for krystalliseringen. Direkte krystallisering fra den vandige løsningen er  
5 foretrukket av økonomiske grunner. Det er likeledes foretrukket å opparbeide de  
chirale karboksylsyrer via ekstraksjon og, eventuelt, påfølgende krystallisering.

Med disse foretrukne typer opparbeiding kan produktet ved  
fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, isoleres i utbytter på fra 60 til 100%,  
fortrinnsvis fra 80 til 100%, spesielt fortrinnsvis fra 90 til 100%, basert på nitrilet  
10 anvendt for reaksjonen. Det isolerte produktet har en høy kjemisk renhet på  
>90%, fortrinnsvis >95%, spesielt fortrinnsvis >98%. I tillegg har produktene høy  
enantiomer renhet, som kan økes ytterligere ved krystallisering.

Produktene oppnådd på denne måten er egnet som utgangsmateriale for  
organiske synteser for å fremstille medikamenter eller agrokjemikalier eller for  
15 racematspaltning.

Oppfinnelsen angår videre en isolert nukleinsyresekvens som koder for et  
polypeptid som har nitrilaseaktivitet, valgt fra gruppen:

a) en nukleinsyresekvens som har sekvensen vist i SEKV ID NR: 1,

20 b) nukleinsyresekvenser som er avledet fra nukleinsyresekvensen vist i SEKV  
ID NR: 1 som et resultat av degenerasjon av den genetiske kode,

Det er videre beskrevet nukleinsyrekonstruksjon, kjennetegnet ved at den  
omfatter en nukleinsyresekvens ifølge krav 1, hvor nukleinsyresekvensen er  
25 bundet til ett eller flere regulatoriske signaler.

Oppfinnelsen omfatter også vektor omfattende en nukleinsyresekvens ifølge  
krav 1 eller en nukleinsyrekonstruksjon ifølge krav 4.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også mikroorganisme omfattende minst  
en introdusert nukleinsyresekvens ifølge krav 1 eller minst én introdusert  
30 nukleinsyrekonstruksjon ifølge krav 4.

Homologer av nukleinsyresekvensen ifølge oppfinnelsen med sekvens  
SEKV ID NR: 1 betyr for eksempel alleliske varianter som har minst 95%  
homologi på det avledede aminosyrenivå, fortrinnsvis minst 97% homologi,

meget spesielt fortrinnsvis minst 98% homologi, over hele sekvensområdet. Det er mulig og fordelaktig at homologiene er høyere over regioner som utgjør del av sekvensene. Aminosyresekvensen avledet fra SEKV ID NR: 1 kan sees i SEKV ID NR: 2. Alleliske varianter omfatter spesielt funksjonelle varianter som kan  
5 oppnås ved delesjon, insersjon eller substitusjon av nukleotider fra sekvensen vist i SEKV ID NR: 1, men med en neglisjerbar reduksjon av den enzymatiske aktivitet av de avlede syntetiserte proteiner. Oppfinnelsen angår således også aminosyresekvenser som er kodet for av gruppen nukleinsyresekvenser beskrevet ovenfor. Oppfinnelsen angår fortrinnsvis aminosyresekvenser kodet for  
10 av sekvens SEKV ID NR: 1.

Homologer av SEKV ID NR: 1 betyr også for eksempel fungale eller bakterielle homologer, forkortede sekvenser, enkeltrådet DNA eller RNA av den kodende og ikke-kodende DNA-sekvens. Homologer av SEKV ID NR: 1 har på DNA-nivå en homologi på minst 60%, fortrinnsvis minst 70%, spesielt fortrinnsvis  
15 minst 80%, meget spesielt fortrinnsvis minst 90%, over hele DNA-regionen angitt i SEKV ID NR: 1.

Homologer av SEKV ID NR: 1 betyr i tillegg derivater så som for eksempel promoter-varianter. Promotere som går forut for de angitte nukleotidsekvenser kan være modifisert ved én eller flere nukleotid-utskiftinger, ved insersjon(er)  
20 og/eller delesjon(er) uten at imidlertid funksjonaliteten eller effektiviteten til promoterne blir negativt påvirket. Promotere kan videre få sin effektivitet øket ved modifikasjon av deres sekvens eller fullstendig erstattes av mer effektive promotere selv fra organismer fra andre arter.

Derivater betyr også varianter hvis nukleotidsekvens i regionen fra -1 til -  
25 200 foran startkodonet eller 0 til 1000 basepar etter stoppkodonet er modifisert på en slik måte at gen-ekspressjon og/eller protein-ekspressjon er endret, fortrinnsvis øket.

SEKV ID NR: 1 eller dens homologer kan fordelaktig isoleres ved metoder kjent for fagfolk fra bakterier, fortrinnsvis fra gram-negative bakterier, spesielt  
30 foretrukket fra bakterier av slekten *Alcaligenes*, meget spesielt foretrukket fra bakterier av slekten og arten *Alcaligenes faecalis*.

SEKV ID NR: 1 eller dens homologer eller deler av disse sekvenser kan isoleres fra andre sopper eller bakterier, for eksempel ved anvendelse av

konvensjonelle hybridiseringsprosesser eller PCR-teknikk. Disse DNA-sekvenser hybridiserer under standard betingelser med sekvensene ifølge oppfinnelsen. Hybridiseringen blir fortrinnsvis utført med korte oligonukleotider fra de konserverte regioner, for eksempel fra det aktive senter og disse kan identifiseres på en måte kjent for fagfolk ved sammenligninger med andre nitrilaser eller nitrilhydrataser. Imidlertid er det også mulig å anvende lenger fragmenter av nukleinsyrene ifølge oppfinnelsen eller de fullstendige sekvenser for hybridiseringen. Disse standard betingelser varierer avhengig av nukleinsyren som anvendes, hvorvidt oligonukleotid, lenger fragment eller fullstendig sekvens anvendes eller avhengig av hvilken type nukleinsyre, DNA eller RNA som anvendes for hybridiseringen. Således er for eksempel smeltetemperaturene for DNA:DNA-hybrider ca. 10°C lavere enn de for DNA:RNA-hybrider av samme lengde.

Standard betingelser betyr for eksempel, avhengig av nukleinsyren, temperaturer mellom 42 og 58°C i en vandig bufferløsning med en konsentrasjon mellom 0,1 og 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM natriumcitrat, pH 7,2) eller i tillegg, i nærvær av 50% formamid, så som for eksempel 42°C i 5 x SSC, 50% formamid. Hybridiseringsbetingelsene for DNA:DNA-hybrider omfatter fordelaktig 0,1 x SSC og temperaturer mellom ca. 20°C og 45°C, fortrinnsvis mellom ca. 30°C og 45°C. Hybridiseringsbetingelsene for DNA:RNA-hybrider omfatter fortrinnsvis 0,1 x SSC og temperaturer mellom ca. 30°C og 55°C, fortrinnsvis mellom ca. 45°C og 55°C. Disse temperaturer angitt for hybridiseringen, er smeltetemperaturer beregnet eksempelvis for en nukleinsyre med en lengde på ca. 100 nukleotider og et G + C-innhold på 50% i fravær av formamid. Forsøksbetingelsene for DNA-hybridiseringen er beskrevet i relevante lærebøker i genetik så som for eksempel Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 og kan beregnes ved formler kjent for fagfolk, for eksempel avhengig av lengden av nukleinsyrene, typen av hybridene eller G + C-innholdet. Fagfolk kan finne ytterligere informasjon om hybridisering i de følgende lærebøker: Ausubel et al. (ed.), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames og Higgins (ed.), 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.

Nukleinsyrekonstruksjonen ifølge oppfinnelsen betyr nitrilasegenet i sekvens SEKV. ID NR. 1 og dets homologer, som fordelaktig har vært funksjonelt bundet til ett eller flere regulatoriske signaler for å øke gen-ekspressjon. Disse regulatorsekvenser er for eksempel sekvenser til hvilke inducere eller repressorer binder og således regulerer ekspressjonen av nukleinsyren. I tillegg til disse nye regulatorsekvenser kan også den naturlige regulering av disse sekvenser være til stede foran de egentlige strukturelle gener og, eventuelt være genetisk modifisert slik at den naturlige regulering blir slått av og ekspressjonen av genene øket.

Nukleinsyrekonstruksjonen kan imidlertid også ha en enklere struktur, hvilket vil si at ingen ytterligere regulatoriske signaler er innsatt foran sekvensen SEKV. ID NR. 1 eller dens homologer og den naturlige promoter med dens regulering ikke er deletert. I stedet blir den naturlige regulatorsekvens mutert på en slik måte at reguleringen ikke lenger finner sted og genekspressjon blir øket.

Nukleinsyrekonstruksjonen kan i tillegg fordelaktig omfatte én eller flere enhancer-sekvenser, som gjør øket ekspressjon av nukleinsyresekvensen mulig, funksjonelt bundet til promoteren. Det er også mulig å innsette fordelaktige ytterligere sekvenser ved 3'-enden av DNA-sekvensene, så som andre regulatoriske elementer eller terminatorer. Nukleinsyrene ifølge oppfinnelsen kan være til stede i én eller flere kopier i konstruksjonen. Konstruksjonen kan også omfatte ytterligere markører så som antibiotisk resistens eller eventuelt auxotrofi-komplementerende gener for seleksjon av konstruksjonen.

Fordelaktige regulatorsekvenser for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er for eksempel til stede i promotere så som *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *lacI<sup>q</sup>*, *T7*, *T5*, *T3*, *gal*, *trc*, *ara*, *SP6*,  $\lambda$ -P<sub>R</sub> eller  $\lambda$ -P<sub>L</sub> promoter, som fordelaktig anvendes i Gram-negative bakterier. Ytterligere fordelaktige regulatorsekvenser er i for eksempel Gram-positive promotere *amy* og *SPO2*, i sopp- eller gjær-promotere *ADC1*, *MF $\alpha$* , *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH*. Også fordelaktig i denne forbindelse er promotere av pyruvat-dekarboksylase og av metanoloksydase fra for eksempel *Hansenula*. Det er også mulig å anvende kunstige promotere for reguleringen.



Nukleinsyrekonstruksjonen blir fordelaktig innsatt i en vektor så som for eksempel et plasmid, fag eller annet DNA for ekspresjon i en vertsorganisme, som gjør optimal ekspresjon av genene i verten mulig. Disse vektorer representerer et ytterligere trekk ifølge foreliggende oppfinnelse. Eksempler på 5 egnede plasmider i *E. Coli* er pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1, λgt11 eller pBdCl, i *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 eller pIJ361, i *Bacillus* pUB110, pC194 eller pBD214, i *Corynebacterium* pSA77 eller pAJ667, i sopper pALS1, pIL2 eller pBB116, i gjær 2μM, pAG-1, YEp6, YEp13 eller pEMBLye23 10 eller i planter pLGV23, pGHlac<sup>+</sup>, pBIN19, pAK2004 eller pDH51. Nevnte plasmider representerer et lite utvalg av de mulige plasmider. Ytterligere plasmider er velkjente for fagfolk og kan for eksempel finnes i boken *Cloning Vectors* (ed. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

15 Nukleinsyrekonstruksjonen inneholder fordelaktig også, for ekspresjon av de andre gener til stede, i tillegg 3' og/eller 5' terminale regulatorsekvenser for å øke ekspresjon, som blir valgt for optimal ekspresjon avhengig av den valgte vertsorganisme og gen eller gener.

Disse regulatorsekvenser skal gjøre spesifikk ekspresjon av genene og 20 proteinekspresjon mulig. Dette kan for eksempel bety, avhengig av vertsorganismen, at genet blir uttrykt eller overuttrykt bare etter induksjon eller at det blir umiddelbart uttrykt og/eller overuttrykt.

Regulatorsekvensene eller faktorene kan videre fortrinnsvis innvirke positivt på og således øke ekspresjon av de innførte gener. Således kan 25 forbedring av de regulatoriske elementene fordelaktig skje på transkripsjonsnivået, ved anvendelse av sterke transkripsjonssignaler så som promotere og/eller enhancere. Imidlertid er det også mulig i tillegg å forbedre translasjon ved for eksempel å forbedre stabiliteten til mRNA.

Ved en annen utførelsesform av vektoren kan vektoren omfattende 30 nukleinsyrekonstruksjonen i henhold til oppfinnelsen eller nukleinsyren ifølge oppfinnelsen også fordelaktig innføres i form av lineær DNA i mikroorganismene og integreres ved heterolog eller homolog rekombinering i genomet i

vertsorganismen. Dette lineære DNA kan bestå av en linearisert vektor så som et plasmid eller bare nukleinsyrekonstruksjonen eller nukleinsyren.

For optimal ekspresjon av heterologe gener i organismer er det fordelaktig å modifisere nukleinsyresekvensene i overensstemmelse med  
5 kodonanvendelsen spesifikt anvendt i organismen. Kodonanvendelsen kan lett etableres på basis av dataanalyser av andre kjente gener i den relevante organismen.

Egnede vertsorganismer for nukleinsyren eller nukleinsyrekonstruksjonen ifølge oppfinnelsen er i prinsippet alle prokaryote eller eukaryote organismer.  
10 Vertsorganismene som fordelaktig anvendes er mikroorganismer så som bakterier, sopper eller gjær. Det er fordelaktig å anvende Gram-positive eller Gram-negative bakterier, fortrinnsvis bakterier av familien Enterobacteriaceae eller Nocardiaceae, spesielt foretrukket bakterier av slektene Escherichia, Pseudomonas eller Rhodococcus. Meget spesielt foretrukket er slekten og arten  
15 Escherichia coli.

Vertsorganismen omfatter videre minst ett proteinholdig middel for å folde polypeptidene den har syntetisert og, spesielt, nukleinsyresekvensene som har nitrilase-aktivitet beskrevet i foreliggende oppfinnelse og/eller genene som koder for dette middel, idet mengden av dette middel til stede er større enn den  
20 svarende til den basiske mengde i den aktuelle mikroorganisme. Genene som koder for dette middel er til stede i kromosomet eller i ekstrakromosomale elementer så som for eksempel plasmider.

## Eksempler

25

Eksempel 1: Rensning av nitrilasen fra *Alcaligenes faecalis* 1650

### 1. Produksjon av cellene

30 *Alcaligenes faecalis* 1650 ble dyrket med risting i dyrkningsmedium A ved 30°C i en periode på 8 timer.

**Dyrkningsmedium A:**

	Gjærekstrakt	5	g/l
	Pepton	3,5	g/l
	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>	5	g/l
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	g/l
	MgSO <sub>4</sub>	0,2	g/l
	FeSO <sub>4</sub>	0,03	g/l
	NaCl	1	g/l
	Butyronitril	1	g/l

10

200 ml av denne forkultur ble anvendt for å inokulere et 10 l gjæringskar inneholdende 8 l friskt medium A. pH, temperaturen, luftstrømningshastigheten og omrøringshastigheten var 7,2, 30°C, 300 l/time og 300 rpm. Etter 22 timer var 81 g våt biomasse oppnådd. Dette svarer til en tørrvekt av celler på 3,8 g/l og en optisk densitet ved 600 nm på 8.

15

**2. Bestemmelse av den enzymatiske aktivitet overfor mandelonitril**

Cellene ble oppnådd som beskrevet i Eksempel 1 og vasket to ganger i 10 mM Na/K-fosfatbuffer, pH 7,2. 40 mg tørrvekt av celler ble resuspendert i 20 ml 10 mM Na/K-fosfatbuffer, pH 6,8 og reaksjonen ble startet ved tilsetning av 8,3 mM mandelonitril. Reaksjonen ble utført ved 40°C med risting. Kinetikken i racematspaltningen ble fulgt ved prøvetaking og deretter fjerning av celler ved hjelp av høy ytelse væskrokromatografi (ODS Hypersil). Mandelonitril, benzaldehyd, mandelsyreamid og mandelsyre ble bestemt i dette tilfellet. Resultatene er vist i Figur 1 [omdannelse av mandelonitril (=mandelsyrenitril) til mandelsyre, batch]. Dannelseshastigheten av mandelsyre er 41,3 U/g tørrvekt av celler med 30% omdannelse, hvor 1 U er definert som dannelsen av 1 µmol mandelsyre pr. minutt ved 40°C.

30

**3. Bestemmelse av den enzymatiske selektivitet overfor mandelonitril**

Cellene ble oppnådd som beskrevet i Eksempel 1 og vasket to ganger i 10 mM Na/K-fosfatbuffer, pH 7,2. 40 mg tørrvekt av celler ble resuspendert i 20 ml 10 mM Na/K-fosfatbuffer, pH 6,8 og reaksjonen ble startet ved tilsetning av 8,3 mM mandelonitril. Reaksjonen ble utført med risting ved 30°C. Kinetikken ble fulgt  
5 ved prøvetaking og deretter fjerning av celler ved hjelp av høy ytelse væsekromatografi (Nukleodex  $\beta$ -PM). S-(+)- og R-(-)-mandelsyre ble bestemt i dette tilfellet. Den optiske renheten av R-(-)-mandelsyren dannet ( $ee_{R-MS}$ ) var 98% ved 50% omdannelse. Selektiviteten til enzymet (= E) var 499 ved 50% omdannelse.

10

#### 4. Rensning

Hvis ikke annet er angitt var 10 mM DTT til stede i alle bufferene under rensingen.

15

##### Trinn 1: Cellesprengning

Celler ble oppnådd som beskrevet i Eksempel 1 fra to 10 l fermenteringer i hvert tilfelle og sentrifugert ned og vasket to ganger med 1 l av 0,1 M Tris/HCl buffer,  
20 pH 7,2. Utbyttet var ca. 162 g våtvekt av celler. I hvert tilfelle ble 81 g våtvekt av celler resuspendert i 160 ml 0,1 M Tris/HCl-buffer, pH 7,2 og splittet fire ganger i en Manton-Gaulin under 750 bar. Homogenatet ble deretter sentrifugert ved 30,000 g i 30 min. og pelleten ble kastet. Supernatanten (140 ml) hadde en restaktivitet på 73%, som vist i Tab. 1.

25

##### Trinn 2: Ionebytterkromatografi

Supernatanten ble fortynnet til 400 ml med buffer A (20 mM Tris/HCl, pH 8,5) og sentrifugert én gang til ved 23,000 g i 20 min. 350 ml ble deretter fylt på en Q-  
30 Sepharose kolonne (diameter 5 cm, høyde 22 cm, volum 432 ml, Q-Sepharose Fast Flow fra Pharmacia) i buffer A. Initielt ble 10% buffer B (som buffer A med 1 M NaCl) anvendt for vasking med en strømningshastighet på 20 ml/min (totalt fylle- og vaske-volum svarte til 1,5 l). Forholdet ble øket til 60% B lineært i løpet

av 90 min. 100% buffer B ble deretter anvendt for vasking fra 91 til 120 min. 100 ml fraksjoner ble oppsamlet. Nitrilasen eluerte mellom fraksjoner 50 og 60. Fraksjonene ble samlet og konsentrert til et volum på 10 ml ved ultrafiltrering gjennom en 10 kDa membran (Amicon).

5

### Trinn 3: Molekylsikt-kromatografi

Konsentratet fra ionebytterkromatografien (trinn 2) ble ytterligere renset i to porsjoner hver på 5 ml ved molekylsikt-kromatografi (Superdex 200 prep. grade, Pharmacia, separeringsområde 10 til 600 kDa, diameter 2,6 cm, høyde 60 cm, volum 325 ml). Deteksjon fant sted ved 280 nm. Kolonnen ble ekvilibrert i 20 mM fosfatbuffer, pH 7,4, 5 mM DTT og 150 mM NaCl og ble operert med en strømningshastighet på 1,5 ml/min. 40 fraksjoner ble oppsamlet. Nitrilhydrolyserende aktivitet ble funnet i fraksjoner 3 til 5.

15

### Trinn 4: Ionebytterkromatografi

De samlede fraksjoner fra molekylsikt-kromatografien (trinn 3) ble renset ytterligere ved ionebytterkromatografi på en Mono Q kolonne (kolonnevolum 1 ml, Mono Q HR515, Pharmacia). Buffer A anvendt var 20 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM DTT og buffer B var samme buffer som i A med 1M NaCl. Strømningshastigheten var 1 ml/min. Den aktive fraksjon fra molekylsikt-kromatografien (ca. 100 ml) ble fortynnet til en konduktivitet på ca. 6 mS/cm og ble fylt direkte på Mono Q-kolonnen og proteinet ble således adsorbent. Kolonnen ble vasket med 5% av buffer B etter fylling. Kolonnen ble eluert med en gradient fra 5% til 40% B i 30 min, fulgt av 100% B i 10 minutter. Nitrilasen ble eluert i fraksjoner 17 og 18 av gradienten.

30

Trinn 1 - 4 av rensingen er angitt i Tabell I.

Tabell I: Rensningsskjema

Prøve	Vol. [ml]	Aktivitet [U/l]	Total aktivitet [mU]	Utbytte [%]	Protein [mg/ml]	Total protein [mg]	Spes. aktivitet [U/g]
før nedbrytning	160	480	76,800	100	-	-	-
etter nedbrytning	140	400	56,000	72,9	-	-	-
<b>Q-Sepharose</b>							
Fylt	140	192	26,880	35	12,4	1736	15
AF	400	77	30,800	40,1	0,26	104	296
<b>Superdex 200</b>							
Fylt	9,5	>378	>3591	4,7	2,41	22,90	>157
AF	43	59	2537	3,3	0,21	9,03	281
<b>MonoQ</b>							
Fylt	100	4,8	480	0,6	0,06	6,33	76
AF	4	>77	308	0,4	0,19	0,76	>405

De aktive fraksjoner (= AF, Tabell I) fra molekylsiktromatografien (trinn 3) og  
 5 ionebytterkromatografien på Mono Q (trinn 4) blir fraksjonert med SDS-PAGE  
 som vist i Figur 2.

#### Trinn 5: Reversert fase (RF) høy ytelse væskechromatografi

10 Den aktive fraksjon (fraksjoner 17 og 18) fra Mono Q kromatografien (trinn 4) ble  
 kontrollert for homogenitet ved RF-kromatografi og ytterligere renses for å  
 forberede trypsinspaltning. Separeringen ble utført med en Abimed-kolonne  
 (3 cm) på et Hewlett-Packard-apparat (HP 1090). Den anvendte mobile fase var  
 buffer A: vann med 0,1% TFA og buffer B: acetonitril med 0,1% TFA.  
 15 Injeksjonsvolum 0,1 ml, strømningshastighet 0,5 ml/min. Elueringsgradienten

hadde den følgende profil:

Minutt	% buffer A	% buffer B
0	80	20
2	80	20
22	30	70
22,1	0	100
24	0	100
25	100	0
30	100	0

Nitrilasen eluerte mellom 12 og 13 minutter. Dette svarer til et 37 kDa bånd i  
 5 SDS-PAGE. Dette bånd ble delvis sekvensert ved anvendelse av Applied  
 Biosystems 494 Procise protein-sekvenserer. Den N-terminale sekvens av 39  
 aminosyrer oppnådd på denne måten er referert til som SEKV ID NR : 3  
 nedenfor. Sekvensen er omfattet i den vedlagte sekvensliste og er: Met Gln Thr  
 Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr  
 10 Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly.

#### Fremstilling av tryptiske peptider

Prøven fra Mono Q kromatografien (trinn 4) ble forbehandlet som følger: proteinet  
 15 (ca. 0,6 mg) ble utfelt med 12,5% TCA og pelleten ble vasket tre ganger med 1  
 ml eter/etanol (1:1). Pelleten ble oppløst i 0,2 ml 6 M guanidin HCl, 25 mM  
 tris/HCl, pH 8,5. 2,6 µl av en 1M DTT-løsning ble satt til denne løsningen for å  
 redusere disulfid-broene. Prøven ble ristet i mørke i 1 time. Proteinene ble deretter  
 omsatt med 1,5 µl av en 4-vinylpyridin-løsning (35%) i mørke i 2 timer.  
 20 Reaksjonen ble stanset ved inkubering med 2,6 µl av en 1M DTT-løsning i 1 time.  
 Det vinylpyridylerte enzym ble rensset ved RF-HPLC som beskrevet ovenfor.  
 Retensjonstiden var nå mellom 10 og 11 minutter. Den aktive fraksjon,  
 identifisert ved dens molekylvekt, ble oppsamlet og konsentrert til 0,02 ml. Dette

ble regulert til 0,2 ml ved tilsetning av 0,01 ml acetonitril og 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5. pH ble korrigeret ved også å tilsette ca. 0,05 ml 0,1 M NaOH. Prøven (beregnet mengde av protein 0,3 mg) ble blandet med 0,032 ml av en 1 mg/ml trypsinløsning i 0,1M Tris/HCl, pH 8,5, 5% acetonitril og inkubert ved 37°C natten over. Spaltningen ble stanset med 0,01 ml eddiksyre, fulgt av sentrifugering. Supernatanten ble separert ved RF-HPLC på C18 (elueringsmiddelsystem: buffer A: vann, 0,1% TFA, buffer B: acetonitril, 0,1 % TFA). Peptider (deteksjon ved 205 nm og 280 nm) ble oppsamlet og sekvensert. Applied Biosystems 494 Procise-proteinsekvenserer ble anvendt. Den indre peptidsekvens på 21 aminosyrer er referert til nedenfor som SEKV ID NR : 4 og den indre peptidsekvens på 11 aminosyrer er referert til som SEKV ID NR : 5. SEKV ID NR : 4 og 5 er inkludert i den vedlagte sekvensliste og er:

SEKV ID NR : 4

Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln

SEKV ID NR : 5

Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys

## 6. Aktivitet av rensed nitrilase overfor mandelonitril

Aktiviteten til den rensede nitrilase overfor mandelonitril ble undersøkt som beskrevet i Eksempel 2. Den spesifikke aktiviteten av det rensede proteinet for mandelonitril var 12,380 U/g protein.

### Eksempel 2: Kloning av nitrilase fra *Alcaligenes faecalis* 1650

Nukleotid-prober ble avledet fra peptidsekvensene SEKV ID NR : 3 og 4 beskrevet i Eksempel 1 og ble syntetisert. Nukleotid-proben avledet fra SEKV ID NR : 3, den N-terminale peptidsekvens, var en 64-ganger degenerert 23 mer (i sekvensen til nukleotidproben blir, A, C, G eller T erstattet med N; A eller G med R; C eller G med S). Den høye prosentdel GC i *Alcaligenes*-stammene beskrevet



i litteraturen (Wada et al., 1992, Nucl. Acids Res., 20, 2111-2118) betyr at i tilfellet av glutamin og isoleucin var seleksjon av den tredje stilling av kodonet forutbestemt. Nukleotid-proben, som er referert til nedenfor som SEKV ID NR : 6, er 5'-primer for den påfølgende PCR, hvor S = C eller G og N = A, C, G eller T og er:

SEKV ID NR : 6

5'-ATGCAGACNAGNAARATCGTSCG-3'

En 256-ganger degenerert 20 mer ble avledet som nukleotidprobe fra SEKV ID NR : 4, den indre peptidsekvens (i sekvensen til nukleotidbasen blir A, C, G eller T erstattet med N; A eller G med R; C eller G med S). Den høye prosentdel av GC i *Alcaligenes*-stammer betyr at i tilfellet av lysin var seleksjon av den tredje stilling av kodonet forutbestemt. Denne nukleotidprobe er 3'-primer for den påfølgende PCR og er referert til nedenfor som SEKV ID NR : 7. Den er inkludert i den vedlagte sekvensliste og er :

SEKV ID NR : 7

5'-TNGCSACNGANGCRATCTTG-3'

Dette par av primere, SEKV ID NR : 6 og 7, ble anvendt for å utføre PCR på kromosomalt DNA fra *Alcaligenes faecalis* 1650. Isolering av kromosomalt DNA fant sted etter celle-lyse med lysozym- og proteinase K-behandling ved den klassiske metoden kjent for fagfolk (Ausubel, F. M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons).

PCR ved anvendelse av Pwo polymerase omfattet denaturering ved 95°C i 3 min; 35 cykler med denaturering ved 95°C i 1 min, primer-hybridisering ved 58°C i 1 min 30 sek. og polymerisasjon ved 72°C i 1 min 30 sek.; og en avslutning av polymerisasjonen ved 72°C i 5 min.

Under disse betingelsene ble et fragment ca. 1 kb i størrelse amplifisert fra kromosomalt DNA fra *Alcaligenes faecalis* 1650. For å klonere PCR-produkter ble

et XbaI restriksjonsspaltningssete og to ytterligere nukleotider (5'-AATCTAGA og 5'-ATTCTAGA) bundet til hver av primerene nevnt overfor og PCR ble gjentatt under de ovennevnte betingelser. Én gang til ble et fragment ca. 1 kb i størrelse amplifisert som etter rensning og XbaI-spaltning, ble ligert inn i analogt spaltet pUC18. Etter transformasjon av *E. coli* JM109 og isolering av det resulterende plasmid, ble DNA rensset ved sekvensering og påfølgende genomisk Southern blot. De molekylærbiologiske og mikrobiologiske metoder for å isolere det fullstendige nitrilasegen (*nit*) var de klassiske, kjent for fagfolk. Den fullstendige nitrilasesekvens er vist i SEKV ID NR: 1.

10

**Eksempel 3:** Homologi med andre proteiner, identifikasjon av den homologe sekvens

Sammenligning med sekvensene fra SWISSPROT protein-database viste at nitrilase-genet i foreliggende oppfinnelse har 11 til 96% homologi med kjente nitrilaser på aminosyrenivå. Den største sekvenshomologi ble funnet med den arylacetonitril-spesifikke nitrilase fra *Alcaligenes faecalis* JM3 (Nagasawa et al., Eur. J. Biochem. 1990, 194, 765-772). De to nitrilase-gener har en identitet på 93,2% på nukleotidnivå over en region på 1071 bp. Den avledete aminosyresekvens har en identitet på 96,1% over en region på 356 aminosyrer. Den minste homologi på 11,4% over en region på 534 aminosyrer ble funnet med nitrilasen fra *Rhodococcus erythropolis* SK92 (EP-A-0 719 862).

20

**Eksempel 4:** Heterolog ekspresjon av nitrilasen i *E. coli*

25

*nit*-genet ble amplifisert for kloning inn i ekspresjonsvektoren pJOE2702. 5'-primeren valgt i dette tilfellet for PCR var den ovennevnte SEKV ID NR : 3, med et NdeI-spaltningssete som overlapper translasjonsstart tilknyttet ved *nit* 5'-enden. Denne primer er referert til nedenfor som SEKV ID NR : 8 og er inkludert i den vedlagte sekvensliste. 3'-primeren valgt var en 24 mer fra 3'-regionen til *nit*-genet, med et BamHI spaltningssete i nabostilling til stoppkodonet som er tilknyttet. Den er referert til nedenfor som SEKV ID NR : 9 og er inkludert i den

30

vedlagte sekvensliste.

5'-TTAATCATATGCAGACAAGAAAAATCGTCCG-3' (= SEKV ID NR: 8)

5'-AAGGATCCTCAAGACGGCTCTTGCACTAGCAG-3' (= SEKV ID NR : 9)

5

PCR ved anvendelse av Pwo polymerase omfattet denaturering ved 94°C i 3 min.; 25 cykler med denaturering ved 93°C i 1 min., primer-hybridisering ved 55°C i 1 min 30 sek. og polymerisasjon ved 72°C i 1 min 30 sek. og en endelig polymerisasjon ved 72°C i 5 min. Det resulterende PCR-fragment ble renset,

10

spaltet med NdeI/BamHI og integrert i den analogt spaltede vektor pJOE2702 (Volff et al., 1996, Mol. Microbiol., 21(5), 1037-1047). Det resulterende plasmid

ble betegnet pDHE 19.2 og er vist i Figur 3. Integreringen via NdeI/BamHI

spaltningssetene betyr at i plasmidet pDHE19.2 er *nit*-genet under

transkripsjonskontroll av promoteren *rha<sub>P</sub>* som er til stede i pJOE2702 og

15

stammer fra den positivt regulerte L-rhamnose Operon *rhaBAD* i *E. coli* (Egan & Schleif, 1994, J.Mol. Biol., 243, 821-829). Terminering av transkripsjon av *nit*-

genet og initiering av translasjon finner likeledes sted via vektorsekvenser. I

t tillegg inneholder plasmidet et gen som overbringer ampicillin-resistens *Ap<sup>R</sup>*.

20

Heterolog ekspresjon av nitrilasen ble vist med *E. coli* JM109 stammen

inneholdende plasmidet pDHE19.2. For dette formål ble stammen JM109

(pDHE19.2) dyrket i TB dyrkningsmedium med 100 µg/ml ampicillin (Tartof,

Hobbs, 1987) med risting ved 37°C. Ved en OD<sub>600</sub> på 1,7 ble kulturen overført

1:200 i friskt TB-medium som inneholdt 0,2% (vekt/volum) L-rhamnose for å

25

indusere nitrilasen og dyrket med risting ved 30°C. Etter 8 timer ble cellene

høstet, vasket med 10 mM Na/K-fosfatbuffer, pH 7,2, resuspendert i samme

buffer til en OD<sub>600</sub> på 10 og splittet ved behandling med ultralyd.

Eksempel 5: Bestemmelse av nitrilase-aktivitet av den rekombinante stamme

30

*E. coli* JM109 (pDHE19.2)

## 1. Produksjon av cellene

E. coli JM109 (pDHE19.2) ble dyrket i TB-medium + 100 µg/ml ampicillin med  
risting ved 37°C i 6 timer. Ved en OD<sub>600</sub> på 4 ble 100 ml av denne forkultur  
anvendt for å inokulere et 10 l gjæringskar inneholdende 8l friskt TB-medium +  
100 µg/ml ampicillin + 2 g/l L-rhamnose. pH, temperaturen,  
5 luftstrømnings hastigheten og omrørings hastigheten var 7,2, 30°C, 300 l/time og  
400-650 rpm. Cellene ble høstet etter 16 timer. Den optiske densiteten ved 600  
nm på dette tidspunkt var 18, tilsvarende en tørrvekt av celler på 7,8 g/l.

## 2. Bestemmelse av den spesifikke aktiviteten overfor mandelonitril

10

Cellene ble oppnådd som beskrevet i Eksempel 1 og vasket i 10 mM Na/K-  
fosfatbuffer, pH 7,2. 2 mg tørrvekt av celler ble resuspendert i 1 ml 10 mM Na/K-  
fosfatbuffer, pH 7,2 og reaksjonen ble startet ved tilsetning av 8,3 mM  
mandelonitril. Reaksjonen ble utført med risting ved 40°C. Kinetikken ble fulgt  
15 ved prøvetaking og påfølgende høy ytelse væskechromatografi (ODS Hypersil).  
Mandelonitril, benzaldehyd, mandelsyreamid og mandelsyre ble bestemt.  
Dannelseshastigheten av mandelsyre er 403 U/g tørrvekt av celler med en  
omdannelse på 30%, idet 1 U er definert som dannelsen av 1 µmol av  
mandelsyre pr. minutt ved 40°C.

20

Eksempel 6: Syntese av R-mandelsyre ved hydrolyse av mandelonitril ved  
anvendelse av E. coli JM109 (pDHE19.2) i suspensjon

25

Mandelonitril i en konsentrasjon på 1,3 g/l ble tilsatt i løpet av 10 timer i et volum  
på 1 l av 10 mM Na/K-fosfatbuffer, pH 7,2, som inneholdt stammen E. coli JM109  
(pDHE19.2) i en konsentrasjon på 2 g/l under omrøring med en bladrører ved  
40°C. Doseringen ble kontrollert via nitril-forbruket. Dannelseshastigheten av R-  
mandelsyre ble fulgt som beskrevet i Eksempel 5. Resultatene er vist i Figur 4.

Eksempel 7: Isolering av R-mandelsyre ved ekstraksjon fra reaksjonsblandingen fra hydrolyse av mandelonitril med *E. coli* JM109 (pDHE19.2) i suspensjon

5 Den vandige mandelsyre-reaksjonsblanding oppnådd i Eksempel 6 ble sentrifugert for å fjerne cellene, regulert til pH 2 med en syre og ekstrahert tre ganger med metyl-tert-butyleter (MTBE). Etter fjerning av det organiske løsningsmidlet fra mandelsyreekstrakten ved inndampning, ble de resulterende hvite mandelsyrekrytaller gjenopløst og undersøkt for kjemisk og optisk renhet  
10 ved høy ytelse væskekromatografi. Den kjemiske renhet var 99% og den optiske renheten av R-mandelsyren var 97,4% ee.

Eksempel 8: Isolering av R-mandelsyre ved krystallisering ved avkjøling fra reaksjonsblandingen fra hydrolyse av mandelonitril med *E. coli* JM109 (pDHE19.2) i suspensjon  
15

Den vandige mandelsyre-reaksjonsblanding oppnådd i Eksempel 6 ble sentrifugert for å fjerne cellene, konsentrert til 40% av det innledende volum med oppvarmning og omrøring og regulert til pH 2 med en syre. Mandelsyren ble  
20 krystallisert ut ved avkjøling i et isbad og de resulterende hvite mandelsyre-krytaller ble filtrert fra med sug og tørket. Krytallene ble gjenopløst og undersøkt for kjemisk og optisk renhet ved høy ytelse væskekromatografi. Den kjemiske renhet var 99,1% og den optiske renheten av R-mandelsyren var 99,8% ee.

25

Eksempel 9: Omdannelse av forskjellige nitriler

*E. coli*-stammen (se Eksempel 6) eller *Alcaligenes*-utgangsstammen ble anvendt for å omdanne forskjellige nitriler. *Alcaligenes*-celler ble dyrket i 400 ml  
30 *Alcaligenes*-medium (se medium A ovenfor) ved 30°C og 160 rpm i 16 timer. Cellene ble høstet ved sentrifugering (4°C og 5000 rpm, 30 min). 150 µl porsjoner av en celsuspensjon ble pipettert inn i hver av brønnene av mikrotiterplaten. Platen ble deretter sentrifugert. Supernatanten ble aspirert fra og cellepelletten ble

vasket to ganger med  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1,42 g/l i Finnaqua, pH 7,2). Substratløsningen (150  $\mu\text{l}$ ) ble deretter pipettert og cellene ble resuspendert. Ett substrat ble satt til hver rekke på 12 hull i mikrotiterplaten. En rekke med substratløsningen, men uten celler ble anvendt som kontroll (= blank).

5

Mikrotiterplatene fikk være i en risteinkubator ved 200 rpm og 30°C i 2 timer.

Cellene ble deretter sentrifugert fra og mengden av  $\text{NH}_4^-$  ioner produsert i supernatanten ble bestemt ved anvendelse av et Biomek apparat. Målingen ble utført ved 620 nm ved anvendelse av et kalibreringsplot konstruert med

10 forskjellige  $\text{NH}_4\text{OH}$ -løsninger (se Figur 5). Substratene anvendt var mandelonitril (= 1), 2-fenylpropionitril (= 2), 2-fenylbutyronitril (= 3), benzylycyanid (= 4), 4-klorbenzylycyanid (= 5), 4-brombenzylycyanid (= 6), propionitril (= 7), 2-metylbutyronitril (= 8, 2-cyanobutan), geranonitril (= 9), valeronitril (= 10), 3-cyanopyridin (= 11), 3-bifenylyl-2-hydroksybutyronitril (= 12), 4-fluorbenzylycyanid  
15 (= 13, 4-fluorfenylacetonitril) og  $\alpha$ -(3-heptyl)-nitro-triacetonitril (= 14). En 0,2 molar lagerløsning i metanol ble fremstilt for hvert av substratene og denne ble fortynnet til 10 mM med  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1,42 g/l i Finnaqua, pH 7,2).

Cellesuspensjonene ble standardisert til 2 g/l tørr biomasse. Tabell II viser gjennomsnittene for en mikrotiterplate-rekke ved omdannelsen.

20

Tabell II: Omdannelse av forskjellige nitriler med nitrilase 1650

Substrat Nr.	$\mu\text{mol/l}$	Aktivitet	% omdannelse
1	2141,2	8,9	86,3
2	1001,1	4,1	70,2
3	24,4	0,1	44,3
4	2210,5	9,2	100
5	2136,3	8,9	100
6	1500,8	6,2	100
7	4,9	0,02	NA
8	-	-	NA

9	-	-	NA
10	113,4	0,47	NA
11	-	-	NA
12	-	-	NA
13	2222,9	9,2	100
14	84,8	0,35	44,1

Figur 6 viser resultatene av omdannelsen som aktivitetsverdier.

5

10

15

20

25

**P A T E N T K R A V**

1. Isolert nukleinsyresekvens som koder for et polypeptid som har nitrilase aktivitet,  
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at den er valgt fra gruppen:
  - a) en nukleinsyresekvens som har sekvensen vist i SEKV ID NR: 1,
  - b) nukleinsyresekvenser som er avledet fra nukleinsyresekvensen vist i  
10 SEKV ID NR: 1 som et resultat av degenerasjon av den genetiske kode,
  - c) homologer av nukleinsyresekvensen vist i SEKV ID NR: 1, som koder  
15 for polypeptider som har minst 98% homologi, over hele sekvensområdet, til SEKV ID NR: 2, uten reduksjon i den enzymatiske virkningen av polypeptidene.
2. Aminosyresekvens,  
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at den blir kodet for av en nukleinsyresekvens ifølge krav 1.
3. Aminosyresekvens ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den blir kodet for av sekvensen vist i SEKV ID  
NR: 1.  
25
4. Nukleinsyrekonstruksjon,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en nukleinsyresekvens ifølge  
krav 1, hvor nukleinsyresekvensen er bundet til ett eller flere regulatoriske  
signaler.  
30
5. Vektor,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en nukleinsyresekvens ifølge



krav 1 eller en nukleinsyrekonstruksjon ifølge krav 4.

6. Mikroorganisme,

5 karakterisert ved at den omfatter minst én introdusert nukleinsyresekvens ifølge krav 1 eller minst én introdusert nukleinsyrekonstruksjon ifølge krav 4.

7. Mikroorganisme ifølge krav 6, karakterisert ved at

10 mikroorganismen er en bakterie av slektene Escherichia, Pseudomonas eller Alcaligenes.

8. Fremgangsmåte for fremstilling av chirale karboksylsyrer med den generelle formel I

15



20 karakterisert ved at den omfatter omdannelse av racemiske nitriler med den generelle formel II



25

i nærvær av en aminosyresekvens ifølge krav 2 eller 3 eller en voksende, sovende eller splittet mikroorganisme ifølge krav 6 eller 7 og hvor minst 25 mmol nitril blir omdannet pr. time og pr. mg protein eller 25 mmol nitril blir omdannet pr. time og pr. g tørrvekt, til de chirale karboksylsyrer,

hvor substituentene og variablene i formlene I og II har de følgende betydninger:

\* et optisk aktivt senter

5

$R^1, R^2, R^3$  uavhengig av hverandre hydrogen, substituert eller usubstituert, forgrenet eller uforgrenet  $C_1$ - $C_{10}$ -alkyl,  $C_2$ - $C_{10}$ -alkenyl, substituert eller usubstituert aryl, hetaryl,  $OR^4$  eller  $NR^4R^5$  og hvor restene  $R^1, R^2$  og  $R^3$  alltid er forskjellige,

10

$R^4$  hydrogen, substituert eller usubstituert, forgrenet eller uforgrenet  $C_1$ - $C_{10}$ -alkyl,  $C_2$ - $C_{10}$ -alkenyl,  $C_1$ - $C_{10}$ -alkylkarbonyl,  $C_2$ - $C_{10}$ -alkenylkarbonyl, aryl, arylkarbonyl, hetaryl eller hetarylkarbonyl,

15

$R^5$  hydrogen, substituert eller usubstituert, forgrenet eller uforgrenet  $C_1$ - $C_{10}$ -alkyl,  $C_2$ - $C_{10}$ -alkenyl, aryl eller hetaryl.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at én av substituentene  $R^1, R^2$  eller  $R^3$  er  $OR^4$ .

20

10. Fremgangsmåte ifølge krav 8 eller 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at én av substituentene  $R^1, R^2$  eller  $R^3$  er aryl.

11. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 8 til 10,

25

k a r a k t e r i s e r t v e d at den blir utført i en vandig reaksjonsløsning ved en pH mellom 4 og 11.

12. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 8 til 11,

30

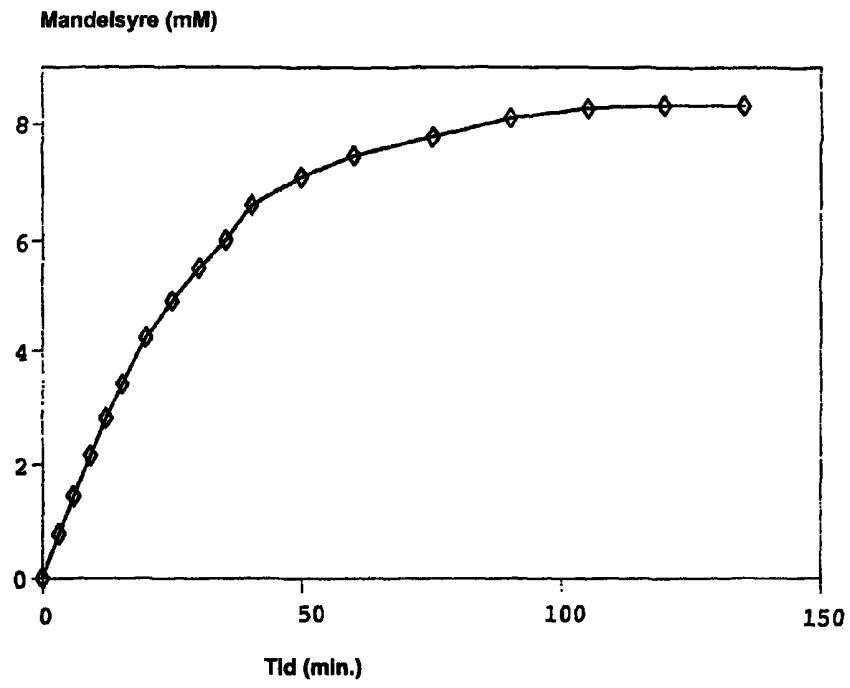
k a r a k t e r i s e r t v e d at fra 0,01 til 10 vekt% av nitril eller fra 0,01 til 10 vekt% av et tilsvarende aldehyd eller keton og fra 0,01 til 10 vekt% av hydrocyansyre blir omsatt ved fremgangsmåten.

13. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 8 til 12,

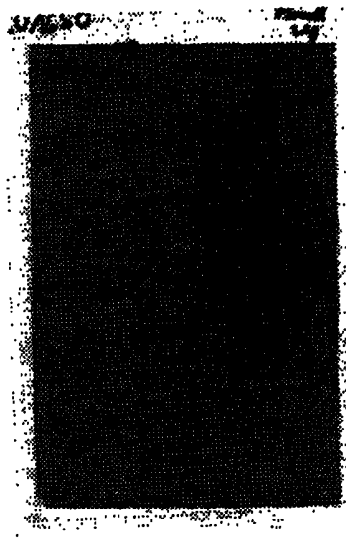
karakterisert ved at den blir utført ved en temperatur mellom 0°C og 80°C.

- 5 14. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 8 til 13, karakterisert ved at den chirale karboksylsyren blir isolert fra reaksjonsløsningen i utbytte på fra 60 til 100% ved ekstraksjon eller krystallisering eller ekstraksjon og krystallisering.
- 10 15. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 8 til 14, karakterisert ved at den chirale karboksylsyren har en optisk renhet på minst 90% ee.

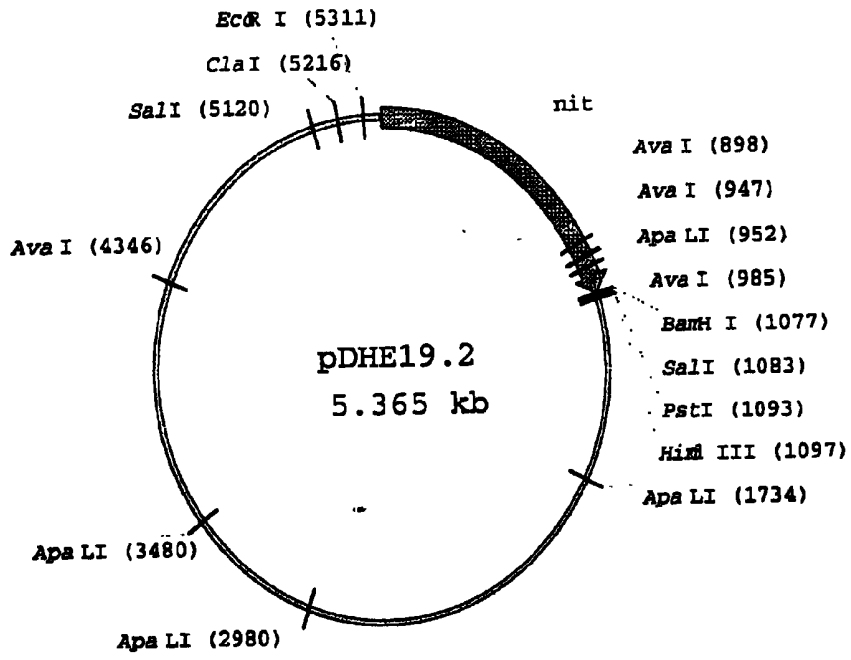
Figur 1

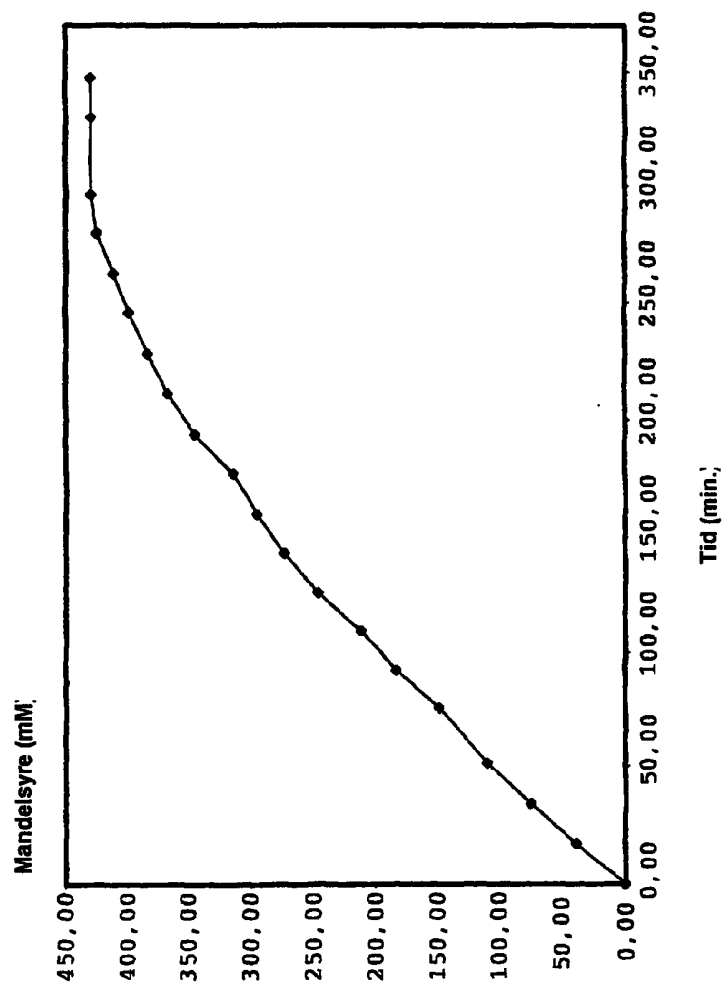


Figur 2



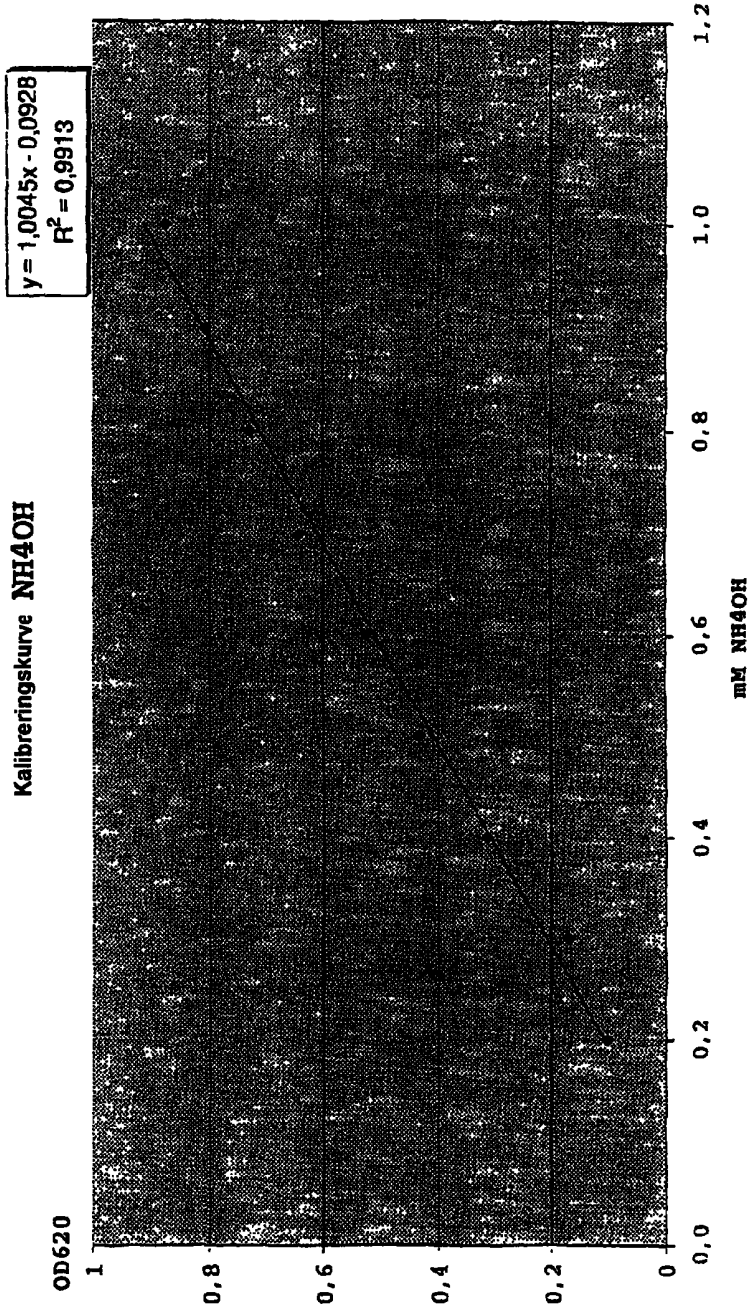
Figur 3





Figur 4

Figur 5





Figur 6

Substratspesifisitet til Nitrilase 165I

