

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: A 1091/2012
(22) Anmeldetag: 09.10.2012
(43) Veröffentlicht am: 15.04.2014

(51) Int. Cl.: **C12N 9/14** (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:
Registry Nummer 935953-75-6
WO 200229042 A2

(71) Patentanmelder:
ERBER AKTIENGESELLSCHAFT
3130 HERZOGENBURG (AT)

(72) Erfinder:
Schatzmayr Gerd
3430 Tulln (AT)

Binder Eva-Maria
3430 Tulln (AT)

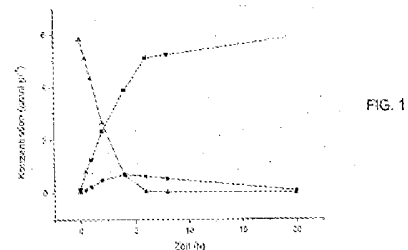
Thamhesl Michaela
7563 Königsdorf (AT)

Moll Dieter
2000 Stockerau (AT)

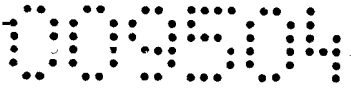
(74) Vertreter:
CUNOW PATENTANWALTS KG
WIEN

(54) **Enzyme zur Transformation von Ergopeptinen sowie Verfahren hierfür**

(57) Enzyme zur Transformation, insbesondere hydrolytischen Spaltung von Ergopeptinen, welche Ergopeptide am Cyclolring hydrolytisch spaltende α/β Hydrolasen sind.



Umwandlung von Ergotamin durch das Enzym der Sequenz ID Nr. 1 (▲) Ergotamin; ■) Ergin; ●) Zwiischenprodukt

-21- 

Zusammenfassung:

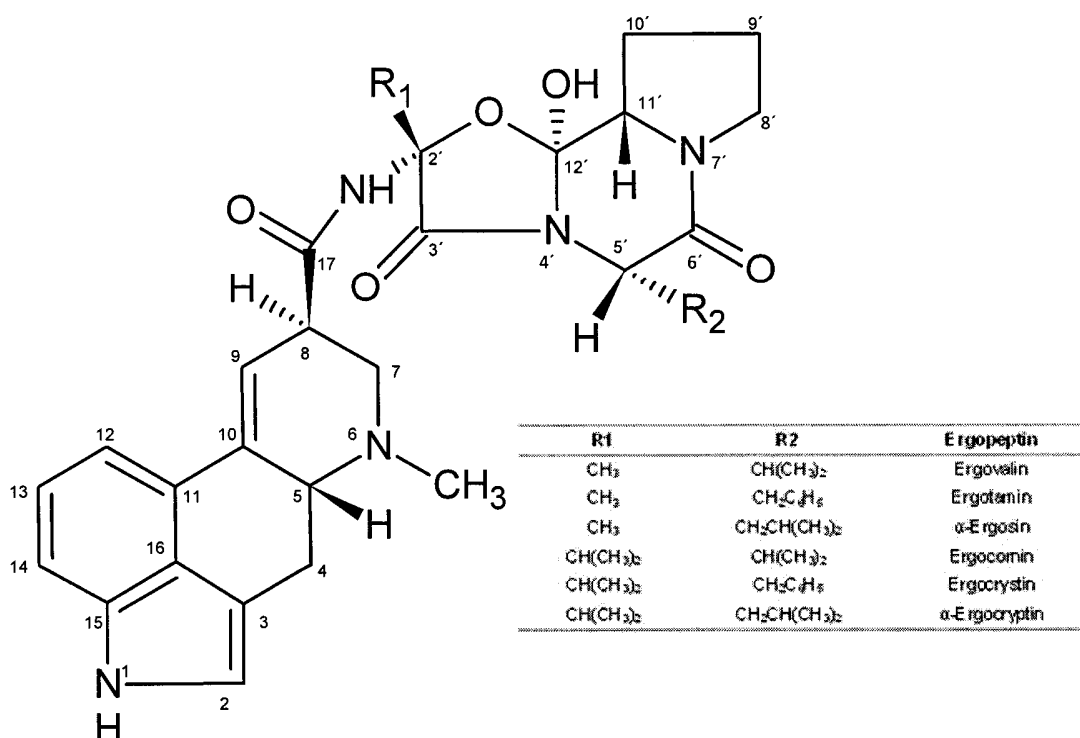
Enzyme zur Transformation, insbesondere hydrolytischen Spaltung von Ergopeptinen, welche Ergopeptide am Cyclolring hydrolytisch spaltende α/β Hydrolasen sind. (Fig. 1)

ERGOT

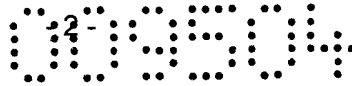
Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Enzyme zur Transformation, insbesondere hydrolytischen Spaltung von Ergopeptinen, ein Verfahren zur Transformation von Ergopeptinen sowie ein Verfahren zur Produktion von Ergopeptine metabolisierenden Enzymen.

Ergopeptine sind eine Gruppe der Ergotalkaloide und sind überdies sekundäre Stoffwechselprodukte, welche von mit Pflanzen assoziierten Pilzen der Gattung *Claviceps*, welche zur Familie der Clavicipitaceae gehören, gebildet werden. Hauptvertreter dieser Gattung ist *Claviceps purpurea*, welches vor allem Getreide, wie Roggen, Weizen, Triticale, Gerste und Mais befällt. Ein anderer Vertreter, nämlich *Claviceps africana* ist weit verbreitet in Hirse zu finden. Weitere Ergotalkaloide produzierende Pilze dieser Familie sind die Grasendophyten der Gattung *Epichloë*, *Neotyphodium* und *Balansia*, aber auch *Aspergillus fumigatus* und diverse *Penicillium* spp. können Ergotalkaloide produzieren.

Allgemein haben die Ergotalkaloide einen tetrazyklischen Ergolinring als charakteristisches Grundgerüst, welcher an Position 6 einen methylierten Stickstoff hat und an Position C-8 verschiedene Substituenten aufweisen kann. Basierend auf diesen Substituenten werden Ergotalkaloide unterteilt in Clavine, einfache Lysergsäureamide, Ergopeptine und Ergopeptame.



Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Neurotransmittern interagieren Ergotalkaloide mit deren Rezeptoren und verursachen eine Vielzahl an Effekten, wie z.B. Vergiftungen, aber auch positive Wirkungen im pharmazeutischen Bereich. Heute stellen Ergotalkaloide aufgrund verbesserter Reinigungsmethoden in Mühlen im Humanbereich kein Problem mehr dar. Aller-



dings stellen sie in der Tierzucht nach wie vor ein Problem dar und verursachen eine Mehrzahl von nachteiligen Symptomen. Insbesondere zählen zu den bei Tieren durch Ergotalkaloide verursachten Symptomen Gängräne, Lahmheit, eine reduzierte Gewichtszunahme, eine erhöhte Atemfrequenz, Reduktion des Gehalts an Serumprolaktin, reduzierte Milchproduktion und ein geringerer Reproduktionserfolg. Hierbei stellen vor allem die Endophyten in Weidegräsern in Amerika, Neuseeland und Australien ein Problem für die Viehzucht dar. So verursachte die Infektion von Rohrschwingel durch den Endophyten *Neotyphodium coenophialum* hohe Verluste für die Nutztierproduzenten.

Für einen Großteil der oben beschriebenen Effekte bzw. bewirkten Symptome sind die Ergopeptine, welche die formenreichste Gruppe der Mutterkornalkaloide darstellen, verantwortlich, welche selbst wiederum nach der unmittelbar an D-Lysergsäure gebundenen Aminosäure unterteilt werden. Vertreter sind hierbei die Ergotamin-Gruppe, umfassend unter anderem Ergotamin, Ergovalin und Ergosin, bei welchen die erste Aminosäure L-Alanin ist. Eine weitere Gruppe ist die Ergotoxin-Gruppe, bei welchen die erste an D-Lysergsäure gebundene Aminosäure L-Valin ist. Vertreter hiervon sind Ergocristin, Ergocryptin oder Ergocornin. Schließlich ist ein weiterer Vertreter die Ergoxin-Gruppe, bei welcher die erste an die Lysergsäure gebundene Aminosäure eine α -Aminobuttersäure ist. Vertreter hiervon sind Ergostin und Ergonin.

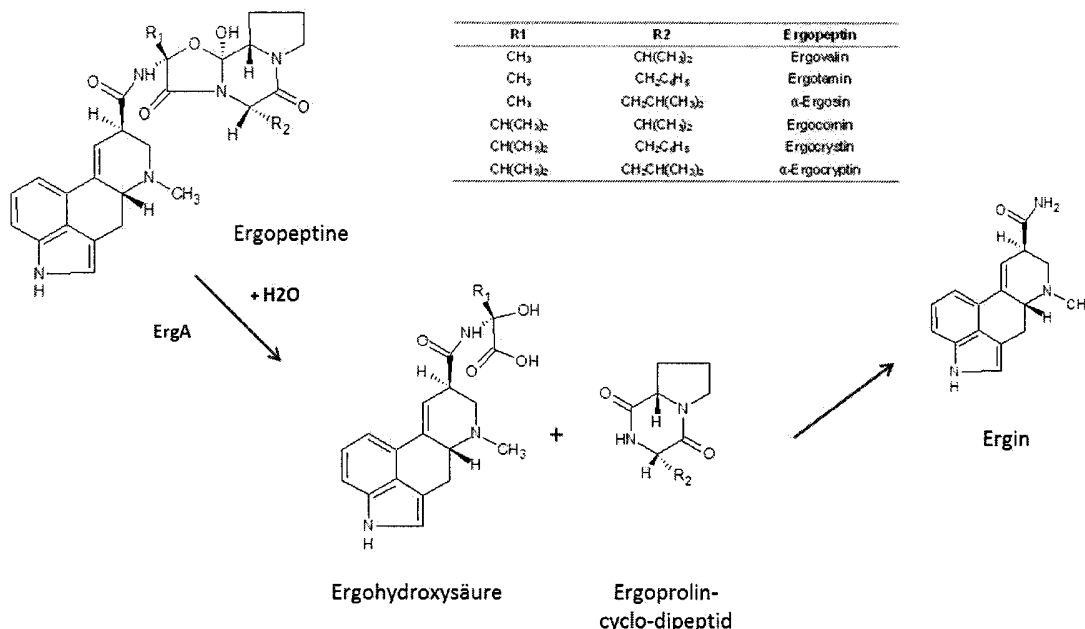
Von diesen ist Ergovalin eines der Hauptalkaloide der endophytisch in Weidegräsern wachsenden *Neotyphodium*- und *Epichloë*-Arten und ist von veterinär-toxikologischer Bedeutung, wie z.B. bei Fescue toxicosis. 9,10 Dihydroergopeptine kommen in der Natur sehr selten vor und konnten bisher nur in *Sphacelia sorghi* nachgewiesen werden. Teilweise synthetisch gewonnene Dihydroergopeptine, wie z.B. Dihydroergotamin und Dihydroergotoxin besitzen eine therapeutische Bedeutung in der Behandlung von Migräne und von Herz-Kreislaufkrankungen. Neben den beschriebenen positiven Wirkungen, insbesondere der therapeutischen Bedeutung von Ergopeptinen ist jedoch ihre toxische Wirkung von nicht zu vernachlässigender Bedeutung, da insbesondere ihre Toxizität aufgrund von beispielsweise der Konsumation von kontaminierten Körnern oder toxischen Endophyten in der Zerstörung bzw. Beeinträchtigung oder Schädigung von zahlreichen physiologischen Systemen, wie den Fortpflanzungsorganen, den wachstumsorientierten Systemen sowie dem kardiovaskulären Strukturen innerhalb des Körpers eines Tieres oder Menschen resultieren. Weiterhin gibt es gegenwärtig kaum Zweifel, dass durch die Aufnahme von mit Ergotaminen bzw. Ergopeptinen befallenen Körnern auch das Magen-Darm-System direkt nachteilig betroffen ist und somit nicht nur die Gesundheit der Tiere sondern auch ihre Leistungsfähigkeit stark beeinträchtigt ist.

Die vorliegende Erfindung zielt nun darauf ab, Enzyme bzw. Enzymzubereitungen sowie die Gene, von welchen diese Enzyme bzw. Enzymzubereitungen abgeleitet sind, zur Verfügung zu stellen, mit welchen es gelingt, Ergopeptine zu weniger toxischen Metaboliten, insbesondere zu Ergin abzubauen.

3

Zur Lösung dieser Aufgabe ist die Erfindung im Wesentlichen dadurch gekennzeichnet, dass die Enzyme Ergopeptine am Cyclolring hydrolytisch spaltende α/β Hydrolasen sind. In dem Ergopeptine am Cyclolring enzymatisch durch eine α/β Hydrolase gespalten werden, gelingt es in einer mehrstufigen Reaktion, welche teilweise spontan erfolgt, die Ergopeptine in Ergin abzubauen. α/β Hydrolasen sind hierbei Mitglieder einer Enzymklasse mit verschiedensten katalytischen Funktionen, welche unter anderem am Cyclolring nativer Ergopeptine angreifen können und diese über ein sekundäres Lysergsäureamid (Ergohydroxysäure) zu Ergin abbauen können.

Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung sind die Enzyme hierbei im Wesentlichen dadurch gekennzeichnet, dass sie eine katalytische Triade, bestehend aus einer nukleophilen Aminosäure sowie Histidin und einer sauren Aminosäure, aufweisen und dass die Triade in einer Peptidkette mit der Faltung einer α/β Hydrolase enthalten ist. Eine besonders vollständige enzymatische Spaltung wird dadurch erreicht, dass die katalytische Triade aus der nukleophilen Aminosäure Serin, aus Histidin und aus einer der sauren Aminosäuren Aspartat oder Glutamat besteht und dass die Triade in einer Peptidkette mit der Faltung einer α/β Hydrolase enthalten ist. Mit einem Enzym, welches die oben genannte katalytische Triade aufweist, ist es überraschenderweise gelungen, Ergopeptine enzymatisch vollständig in Ergin zu spalten. Die enzymatische Spaltung findet hierbei an der Stelle 3' des Cyclolrings von Ergopeptinen statt, bei welchem hydrolytischen Spalten die Gruppe aus drei Ringen, nämlich dem Cyclolring, Lactamring und Pyrrolidinring in mehreren Schritten abgespalten wird und schließlich Ergin gebildet wird, wie dies dem nachfolgenden Reaktionsschema entnehmbar ist.



Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung ist das Enzym im Wesentlichen dadurch gekennzeichnet, dass die α/β Hydrolase einen nukleophilen Ellbogen mit der Sequenz Gly-Gln-



Ser-Arg-Asn-Gly aufweist. Wenn die α/β Hydrolase einen nukleophilen Ellbogen mit der Sequenz Gly-Gln-Ser-Arg-Asn-Gly aufweist, gelingt eine besonders rascher enzymatischer Abbau von Ergopeptin zu Ergohydroxysäure, welche spontan in Ergin umgewandelt wird. Der nukleophile Ellbogen ist hierbei ein zentrales Element der α/β Hydrolasen. In diesem befindet sich die katalytisch aktive Aminosäure mit der nukleophilen Seitenkette in einer Struktur mit unüblichen Bindungswinkeln, die in ungünstigen Bereichen des Ramachandran-Plots liegen (Ollis et al., 1992). Die Aminosäuresequenz des nukleophilen Ellenbogens, im vorliegenden Fall Gly-Gln-Ser-Arg-Asn-Gly, ist konserviert und kann z. B. auch zur Klassifizierung von α/β Hydrolasen herangezogen werden (Kourist et al., 2010).

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung gelingt ein vollständiger Abbau dadurch, dass das Enzym die Sequenz ID Nr. 1 aufweist. Das Enzym mit der Sequenz ID Nr. 1 hat sich als für die katalytische Spaltung von Ergopeptinen in Ergin als besonders wirkungsvoll erwiesen. Die nukleophile Aminosäure Serin nimmt eine zentrale Rolle in einer konservierten Struktur, den nukleophilen Ellbogen ein. Der nukleophile Ellbogen ist zwischen dem β 5-Strang und der darauffolgenden α -Helix lokalisiert und weist die Consensus-Sequenz Sm-X-Nu-X-Sm auf, wobei Sm eine kleine Aminosäure ist, X eine beliebige Aminosäure ist und Nu eine nukleophile Aminosäure bedeutet. Die Sequenz ID Nr. 1 lautet G-Q-S-R-N. Die α/β Hydrolase der Sequenz ID Nr. 1 gehört hierbei zu den Enzymen, welche für ihre Wirkungsweise keinerlei Cofaktoren benötigen.

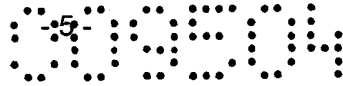
Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung ist das Enzym dadurch gekennzeichnet, dass es eine von der Sequenz ID Nr. 1 verschiedene N- oder C-terminale Sequenz, insbesondere ein Enzym mit der Sequenz ID Nr. 5 aufweist, und dass es wenigstens 96 % Sequenzidentität mit der Sequenz ID Nr. 1 aufweist. Überraschender Weise konnte gezeigt werden, dass neben der Sequenz ID Nr. 1 auch eine Modifikationsbreite derselben möglich ist, wobei insbesondere der N-Terminus verändert werden kann. Besonders gute Ergebnisse werden hierbei erzielt, wenn das Enzym mit veränderter Startsequenz eine Sequenzidentität von wenigstens 96 % der Sequenz ID Nr. 1 aufweist.

Enzyme mit einem von der Sequenz ID Nr. 1 abweichenden N-Terminus sind in gleicher Weise befähigt, Ergotamin vollständig umzusetzen.

Um Ergopeptide vollständig abzubauen bzw. zu detoxifizieren, zielt die vorliegende Erfindung weiterhin darauf ab, ein Verfahren zur enzymatischen Transformation von Ergopeptiden zur Verfügung zu stellen.

Zur Lösung dieser Aufgabe ist das erfindungsgemäße Verfahren im Wesentlichen dadurch gekennzeichnet, dass die Ergopeptide hydrolytisch am Cyclolring zu primären Metaboliten gespalten werden.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass anschließend an eine hydrolytische Spaltung der Ergopeptide am Cyclolring in Ergohydroxysäure und Egoprolin-cyclo-dipeptid eine



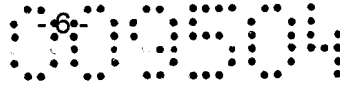
spontane Umsetzung dieser Zwischenprodukte in insbesondere Ergin sowie Pyruvat erfolgt. Die hierbei gebildeten Reaktionsprodukte weisen im Vergleich zu dem Ausgangsprodukt eine deutlich verringerte, wenn nicht sogar vernachlässigbare Toxizität auf.

Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren im Wesentlichen so geführt, dass die Spaltung durch einen nukleophilen Angriff am C3' Atom des Cyclolrings erfolgt. Besonders vorteilhafte und vollständige Ergebnisse können hierbei dadurch erzielt werden, dass der nukleophile Angriff am C3'-Atom des Cyclolrings durch eine in einer Peptidkette mit der Faltung einer α/β Hydrolase enthaltenden katalytische Triade, die aus der nukophilen Aminosäure Serin, aus Histidin und einer der sauren Aminosäuren Aspartat oder Glutamat besteht, erfolgt. Mit einer derartigen Verfahrensführung wird ein rascher und vollständiger Abbau der Ergopeptide in primäre Metaboliten erzielt, welche wie dies einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung entspricht, weiter zu Ergin umgesetzt werden. Eine derartige Umsetzung erfolgt gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung durch eine spontane Reaktion, wobei hierfür die Umgebungsbedingungen so gewählt sind, dass die Zwischenprodukte des Abbaus unmittelbar und vollständig weiter zu Ergin umgesetzt werden.

Wie dies einer Weiterbildung der Erfindung entspricht, wird das Verfahren so geführt, dass die weitere Umsetzung der bei hydrolytischen Spaltung mit der α/β Hydrolase gebildeten primären Metaboliten durch im Reaktionsmilieu vorkommende Enzyme erfolgt. Bei einer derartigen Verfahrensführung wird von den in natürlichen Umgebungen immer vorhandenen Enzymen Gebrauch gemacht, welche überraschenderweise die primären Metaboliten vollständig zu Ergin abzubauen vermögen.

Die vorliegende Erfindung zielt weiterhin darauf ab, ein Verfahren zur Produktion von Ergopeptinen metabolisierenden Enzymen zur Verfügung zu stellen. Zur Lösung dieser Aufgabe ist das erfindungsgemäße Verfahren so geführt, dass ein Gen für ein Enzym, welches gemäß der Erfindung codiert, in einem Expressionsvektor kloniert wird, in prokaryotische und/oder eukaryotische Wirtszellen transformiert wird und in einer Wirtszelle exprimiert wird. Mit einer derartigen Verfahrensführung gelingt es, hohe Enzymkonzentrationen zur Verfügung zu stellen, welche in der Lage sind, sechs Ergopeptide, nämlich Ergotamin, Ergovalin, Ergocornin, Ergocristin, Ergocryptin und Ergosin sowie deren jeweilige isomeren Formen, nämlich Ergotaminin, Ergovalinin, Ergocorninin, Ergocristinin, Ergocryptinin und Ergosinin vollständig zu Ergin umzusetzen. Vorzugsweise wird hierbei ein Gen mit der Sequenz ID Nr. 2, 4 oder 6 eingesetzt, wodurch die gebildeten Enzymkombinationen weitere erhöht werden können

Besonders hohe Enzymaktivitäten werden gemäß der vorliegenden Erfindung dann erzielt, wenn das Verfahren so geführt wird, dass das Gen in einen der Mikroorganismen gewählt aus *Pichia pastoris*, *E. coli* oder *Bacillus subtilis* als Wirtszelle transformiert wird und darin exprimiert wird.



Eine noch weitere Erhöhung der Enzymaktivität kann dadurch erzielt werden, dass das Verfahren so geführt wird, dass das Enzym der Sequenz ID Nr. 1, insbesondere das his-getaggte Enzym mit der Sequenz ID Nr. 5 mit Affinitätschromatographie gereinigt wird. Mit einem gereinigten Enzym der Sequenz ID Nr. 5 gelingt nicht nur eine vollständige Umsetzung von Ergopeptinen in Ergin, sondern insbesondere weist ein derartig gereinigtes Enzym eine besonders hohe katalytische Aktivität, insbesondere in einem pH-Wertbereich zwischen etwa 6 und etwa 9 auf.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung des Verfahrens wird hierbei die erste Stufe der Reaktion so geführt, dass der Cyclolring mit dem Enzym der Sequenz ID Nr. 1 gespalten wird. Bei einer derartigen Verfahrensführung gelingt es die Ergopeptide nahezu vollständig in wenig-vasokonstriktive Metaboliten umzusetzen.

Die Enzympräparation gemäß der vorliegenden Erfindung wird bevorzugt in einem Futtermittel- oder Silagezusatz angewandt. Bei einem derartigen Einsatz gelingt es lediglich durch Beimischung der Enzympräparation, die auf den Futtermittel- oder Silagezusatz vorhandenen Ergopeptide teilweise vor der Verfütterung und teilweise im Magen-Darm-Trakt der Tiere zu detoxifizieren.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Figuren und Ausführungsbeispielen näher erläutert. In diesen zeigen:

Fig. 1 die Kinetik der Umsetzung von Ergotamin mit dem Enzym der Sequenz ID Nr. 1 zu Ergin,

Fig. 2 die Umsetzung der Ergopeptide Ergocornin, Ergocryptin, Ergosin, Ergovalin und Ergotamin durch das Enzym der Sequenz ID Nr. 1 mit den exemplarischen Negativkontrollen für Ergocryptin und Ergosin,

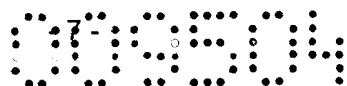
Fig. 3 die Darstellung des *P. pastoris* Expressionsvektors pGAPZ alphaC mit dem Gen Sequenz ID Nr. 2,

Fig. 4 die Darstellung von *B. subtilis* Expressionsvektor pET43 mit dem Gen Sequenz ID Nr. 2.

Beispiel 1:

Bestimmung der katalytischen Aktivität von dem Enzym der Sequenz ID Nr. 1

Das Gen mit der Sequenz ID Nr. 2, welches eine katalytische Triade aus S94-D234-H270 aufweisende α/β -Hydrolase codiert, wurde unter Anwendung von Standardverfahren in den Expressionsvektor pET28a(+) kloniert, in *E. coli* transformiert und exprimiert. Nach der Expression in *E. coli* BL21(DE3) wurde das his-getaggte Enzym mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die Enzymkonzentration wurde mittels Pierce BSA Protein Assay Kit bestimmt und das Enzym in Aktivitätsversuchen eingesetzt. Die Versuche wurden in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,0) bei 25 °C durchgeführt.



Im Rahmen der Detoxifikationsversuche wurden eine Enzymkonzentration von 0,079 µg/ml und eine Ergotaminkonzentration von 5 mg/kg eingesetzt.

Für einen weiteren Versuch zur Umsetzung der 6 Ergopeptine, nämlich Ergotamin, Ergovalin, Ergocornin, Ergocristin, Ergocryptin oder Ergosin sowie deren jeweiligen isomeren Formen, nämlich Ergotaminin, Ergovalinin, Ergocorninin, Ergocristinin, Ergocryptinin sowie Ergosinin wurden 1,58 µg/ml des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 und 10 mg/kg Ergotamin bzw. von den restlichen Ergopeptinen bzw. deren Epimeren die äquimolare (Summen)Konzentration eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 gezeigt.

Die Proben wurden mittels HPLC-FLD bzw. HPLC-MS/MS analysiert, wobei jeweils die Konzentration der Summe der jeweiligen Epimere analytisch bestimmt wurde. Parallel zur Abnahme der Ergopeptinkonzentration im Laufe der enzymatischen Reaktion wurde die Bildung der Ergohydroxysäure (Metabolit 1) und des Ergoprolin-cyclo-dipeptids (Metabolit 2) beobachtet. Im weiteren Reaktionsverlauf wurde die Umsetzung von Metabolit 1 zu Ergin detektiert.

In Fig. 1 ist exemplarisch die Kinetik der Umsetzung von Ergotamin mit Sequenz ID Nr. 1 gezeigt. Im Laufe der Reaktion wurden geringe Mengen eines instabilen Zwischenprodukts detektiert, das Endprodukt der Reaktion war Ergin. Aus Fig. 1 ist ersichtlich, dass innerhalb von 4 Stunden ein nahezu vollständiger Abbau von Ergotamin durch Sequenz ID Nr. 1 zu Ergin erfolgte. Der Reaktionsverlauf sämtlicher anderer Ergopeptine, nämlich Ergovalin, Ergocornin, Ergocristin, Ergocryptin oder Ergosin sowie deren jeweiligen isomeren Formen, nämlich Ergovalinin, Ergocorninin, Ergocristinin, Ergocryptinin sowie Ergosinin ist vergleichbar.

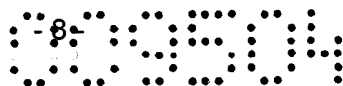
Beispiel 2:

Identifizierung des N-Terminusses des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1

Zur Identifizierung des N-Terminusses des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 wurden die Gene mit der Sequenz ID Nr. 2 und der Sequenz ID Nr. 6 unter Anwendung von Standardverfahren in pET28a(+) kloniert und *E. coli* transformiert.

Nach Expression wurden die Bakterienzellen in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer aufgenommen und mittels French Press (20 000 psi) lysiert. Die Lysate wurden in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 in Abbauansätzen von 5 mg/kg Ergotamin eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 25 °C inkubiert und die Proben mittels HPLC-FLD analysiert.

Die Ergebnisse des Abbauersuchs zeigten, dass beide Enzyme befähigt sind, Ergotamin umzusetzen. Jenes Enzym mit kürzeren Nukleotidsequenzen zeigte jedoch eine deutlich höhere Aktivität, so konnte diese Variante auch in der 1:1000 Verdünnung Ergotamin vollständig umsetzen, die längere Variante zeigte bereits in der 1:100 Verdünnung nur mehr geringe Aktivität.



Beispiel 3:

Ermittlung des Temperaturbereichs der Aktivität und die Temperaturstabilität des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1.

Zur Ermittlung der optimalen Temperatur für die Aktivität des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 wurden 0.1 µg/ml Enzym in Teorell-Stenhagen-Universalpuffer (pH 9.0) mit 5 mg/kg Ergotamin bei unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 10°C bis 50°C inkubiert. Dabei zeigte das Enzym in einem Bereich von 10°C bis 35°C Aktivität, mit einem auf die Anfangsgeschwindigkeit bezogenen Optimum von 35°C.

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurde das Enzym bei unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 10°C bis 60°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Enzymlösungen in einer Konzentration von 0.1 µg/ml in Teorell-Stenhagen-Universalpuffer (pH 7.0) mit 0.1 mg/ml BSA und 5 mg/kg Ergotamin bei 25°C inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, dass das Enzym bis zu einer Temperatur von 30°C stabil ist, es nach einer Inkubation bei 40°C noch Aktivität zeigte, es allerdings zwischen 35°C und 40°C zu einem Abfall der Aktivität kam. Zusammenfassend zeigte sich, dass das Enzym der Sequenz ID Nr. 1 im Wesentlichen bei den im Verdauungstrakt vorherrschenden Temperaturbedingungen das Temperaturoptimum hat.

Beispiel 4:

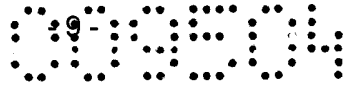
Ermittlung des pH-Optimums der Aktivität und die pH-Stabilität des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1

Zur Ermittlung des optimalen pH-Bereichs für die Aktivität von ErgA wurden 0.1 µg/ml Enzym mit 5 mg/kg Ergotamin bei unterschiedlichen pH-Werten unter Verwendung des Teorell-Stenhagen-Universalpuffers bei 25°C inkubiert. Dieser Puffer wurde ausgewählt da man durch die Kombination von Citrat, Phosphat und Borat mittels Salzsäure in einem Bereich von pH 2 bis pH 12 die gleiche Pufferkapazität einstellen kann. Dabei zeigte das Enzym in einem Bereich von pH 6 bis pH 11 Aktivität, mit einem kleinen Aktivitätsplateau bei pH 8 bis pH 9.

Zur Bestimmung der pH-Stabilität wurde das Enzym bei unterschiedlichen pH-Werten im Bereich von pH 2 bis pH 12 für 1 h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzymlösungen in einer Konzentration von 0.1 µg/ml in Teorell-Stenhagen-Universalpuffer (pH 7.0) mit 0.1 mg/ml BSA und 5 mg/kg Ergotamin bei 25°C inkubiert. Auch hier zeigte sich ein Aktivitätsplateau, diesmal im Bereich von pH 6 bis pH 9, mit stark abfallender Aktivität außerhalb dieses Bereichs. Durch die Aktivität in diesem Bereich ist eine technologische Anwendung des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 als Futtermittelzusatz gewährleistet.

Beispiel 5:

Expression des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 in *Pichia pastoris*



Das Gen der Sequenz ID Nr. 2 wurde in pGAPZ alphaC kloniert, in *P. pastoris* transformiert und unter Verwendung von Standardmethoden exprimiert. Der Expressionsvektor pGAPZ alphaC mit dem Gen der Sequenz ID Nr. 2 ist in Fig. 3 gezeigt. Ein Abbauversuch wurde in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7.0) mit 5 mg/kg Ergotamin bei 25°C durchgeführt. Vom Kulturüberstand wurde eine 1:100 Verdünnung eingesetzt. Die Proben wurden mittels HPLC-FLD analysiert. Anhand von Ergebnissen aus SDS-PAGE und Abbauversuchen konnte eine Expression des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 in den Kulturüberstand bestätigt werden.

Beispiel 6:

Expression des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 in *Bacillus subtilis*

Das Gen der Sequenz ID Nr. 2 wurde in pHT43 kloniert, in *B. subtilis* transformiert und unter Verwendung von Standardmethoden exprimiert. Der Expressionsvektor pHT43 mit dem Gen der Sequenz ID Nr. 2 ist in Fig. 4 gezeigt. Ein Abbauversuch wurde in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 5 mg/kg Ergotamin bei 25 °C durchgeführt. Vom Kulturüberstand wurde eine 1:10 Verdünnung eingesetzt. Die Proben wurden mittels HPLC-FLD analysiert. Anhand der Ergebnisse aus SDS-PAGE und Abbauversuchen konnte eine Expression von ErgA in den Kulturüberstand bestätigt werden.

Beispiel 7:

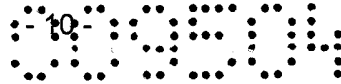
Abbauversuch im Pansenmodell

Die Aktivität des ergotalkaloid-abbauenden Enzymes des Enzyms der Sequenz ID Nr. 1 wurde in einem in vitro Pansenmodell getestet. Dafür wurde frischer Pansensaft 1:1 mit einer Lösung bestehend aus künstlichen Pansensaft, Heu und einer Getreidemischung aus Weizen, Mais und Soja verdünnt. Zur Darstellung der Umsetzung der Ergopeptide wurde ein Ansatz mit dem Enzym der Sequenz ID Nr. 1 (1 µg/ml) und 5 mg/kg Ergotamin versetzt. Gärröhrchen wurden über Septen eingesetzt und die Ansätze im Wasserbad bei 39°C inkubiert. Die Analytik mittels HPLC/ESI-MS/MS zeigte, dass Ergotamin im Pansenmodell vollständig zu Ergin sowie Lysergsäure umgesetzt werden konnte.

Literatur:

MARTINKOVA, L., KREN, V., CVAK, L., OVESNA, M. & PREPECHALOVA, I. 2000. Hydrolysis of lysergamide to lysergic acid by *Rhodococcus equi* A4. *J.Biotechnol.*, 84, 63-66.

KOURIST, R., JOCHENS, H., BARTSCH, S., KUIPERS, R., PADHI, S.K., GALL, M., BÖTTCHER, D., JOOSTEN, H.-J. & BORNSCHEUER, U. T., 2010, The α/β Hydrolase Fold 3DM Database (ABHDB) as a Tool for Protein Engineering, *ChremBioChem*, 11,1635-1643.



OLLIS, D. L., CHEAH, E., CYGLER, M., DIJKSTRA, B., FROLOW, F., FRANKEN, S.M., HAREL, M., REMINGTON, S.J., SILMAN, I. & SCHRAG, J. 1992, The alpha/beta hydrolase fold, Protein Eng., 5, 197-211

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Erber Aktiengesellschaft
Thamesl, Michaela
Moll, wulf-Dieter
Schatzmayr, Gerd
Binder, Eva Maria

<120> Enzyme zur Transformation von Ergopeptinen sowie Verfahren hierfür

<130> ----

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 309

<212> PRT

<213> Rhodococcus erythropolis

<400> 1

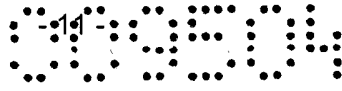
Met Pro Leu Val Val Leu Ser Asp Gly Thr Arg Ile His Val Glu Thr
1 5 10 15

Ser Gly Asn Gly Val Pro Ala Leu Val Pro Cys Val Gly Ser Ser Val
20 25 30

Pro Phe Glu Arg Thr Phe Gly Glu Glu Leu Lys Thr Asp Ile Gln Tyr
35 40 45

Asn Phe Val Glu Val Arg Gly Thr Ser Arg Ser Asp Gly Glu Pro Ser
50 55 60

Glu Val Ala Ser Leu Asp Arg Ile Ser Asp Asp Leu Glu Glu Val Arg



65

70

75

80

Gln Leu Leu Gly Leu Asp Lys Val Ile Ala Leu Gly Gln Ser Arg Asn
85 90 95

Gly Met Met Ala Ala His Tyr Ala Gln Lys Tyr Pro Asn Ser Val Leu
100 105 110

His Leu Val Thr Ile Gly Thr Pro Ala Ser Leu Ser Met Ile Lys Asn
115 120 125

Glu Glu Tyr Trp Asn Ala Phe Ala Asp Asp Glu Arg Lys Arg Leu Arg
130 135 140

Ala Glu Asn Asp Ala Ala Met Glu Arg Glu Gly Leu Leu Asp Leu Asp
145 150 155 160

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

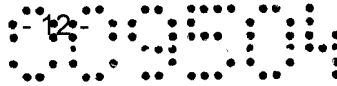
Ala Val Tyr Phe Tyr Asp Pro Thr Thr Leu Met Asn Asp Trp Trp Asp
180 185 190

Ala Ser Leu Leu Ser Arg Thr Phe Glu Val Val Met Ala Ser Asn Met
195 200 205

Gly Trp Ala Asp Phe Asp Leu Val Gln Thr Leu Gln Asn Ser Asp Val
210 215 220

Pro Ala Phe Val Thr Phe Gly Lys Tyr Asp Phe Met Val Ser Pro Leu
225 230 235 240

Pro Lys Pro Gly Asn Pro Val Asp Gly Lys Ala Gly Leu Phe Glu Asp
245 250 255



Ile Pro Gly Val Arg Val Glu Val Phe Glu Lys Ser Gly His Phe Pro
 260 265 270

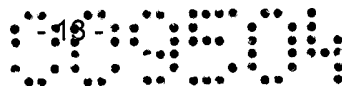
Tyr Trp Glu Gln Glu Gln Glu Phe Ala Arg Arg Tyr Arg Asp Trp Val
 275 280 285

Ala Thr Leu Pro Glu Ser Ala Val Arg Ala Ala Glu Ala Met Thr Pro
 290 295 300

Asn Gly Ile Arg Gln
 305

- <210> 2
- <211> 930
- <212> DNA
- <213> Rhodococcus erythropolis

<400> 2
 atgccattgg tggttctgag cgacggcaca cgcattcacg tcgaaacttc aggcaacggc 60
 gtccttgcgc ttgttccatg cgtgggatcg agcgttccgt tcgagcggac gttcggtgag 120
 gaattgaaga cggatattca gtacaacttc gtcgaggtcc gcggtacctc caggtccgac 180
 ggcgaaccga gtgaggtcgc ctactcgat cgtatttccg acgacctcga agaggtccgt 240
 cagttggttg gtttgacaa ggtcatcgca ctcgccagt cgcgtaacgg catgatggcc 300
 gctcactacg cgcagaagta tccgaattcg gtcctacacc tggtaacat cggcaccct 360
 gcgtctttga gtatgatcaa gaacgaagaa tactggaacg cgttcgaga cgacgagcgt 420
 aaacgcctcc gcgctgaaaa cgacgcggcg atggagcgcg agggctcct cgacctgac 480
 aacctgaata ctgccgaaaa gatcgttcgc ctcttcgatc ttgaaggcgc agtgtacttc 540
 tacgatccaa cgacactcat gaatgattgg tgggacgctt cacttctcag ccggacattc 600
 gaagtcgtca tggcgtcgaa tatggggttg gcagacttcg acctcgttca aacctgcag 660
 aattctgatg tccccgcttt cgtaacgttc ggaaagtacg acttcatggt ctccccgctg 720
 ccgaaaccag gaaatccggt tgacggaaaa gccggcctct tcgaagatat tccgggtgct 780



cgggtagagg tcttcgagaa gaggggcac ttcccgtatt gggagcagga acaggaattt 840
gctcgccgct atcgcgattg ggtcgcaacc cttccggaat ccgctgtacg cgctgcagaa 900
gctatgacgc ccaatggcat tcggcagtga 930

<210> 3
<211> 319
<212> PRT
<213> Rhodococcus erythropolis

<400> 3

Met Ala Arg Pro Lys Arg Arg Arg Ser Ala Met Pro Leu Val Val Leu
1 5 10 15

Ser Asp Gly Thr Arg Ile His Val Glu Thr Ser Gly Asn Gly Val Pro
20 25 30

Ala Leu Val Pro Cys Val Gly Ser Ser Val Pro Phe Glu Arg Thr Phe
35 40 45

Gly Glu Glu Leu Lys Thr Asp Ile Gln Tyr Asn Phe Val Glu Val Arg
50 55 60

Gly Thr Ser Arg Ser Asp Gly Glu Pro Ser Glu Val Ala Ser Leu Asp
65 70 75 80

Arg Ile Ser Asp Asp Leu Glu Glu Val Arg Gln Leu Leu Gly Leu Asp
85 90 95

Lys Val Ile Ala Leu Gly Gln Ser Arg Asn Gly Met Met Ala Ala His
100 105 110

Tyr Ala Gln Lys Tyr Pro Asn Ser Val Leu His Leu Val Thr Ile Gly
115 120 125

Thr Pro Ala Ser Leu Ser Met Ile Lys Asn Glu Glu Tyr Trp Asn Ala
130 135 140

Phe Ala Asp Asp Glu Arg Lys Arg Leu Arg Ala Glu Asn Asp Ala Ala
145 150 155 160

Met Glu Arg Glu Gly Leu Leu Asp Leu Asp Asn Leu Asn Thr Ala Glu
165 170 175

Lys Ile Val Arg Leu Phe Asp Leu Glu Gly Ala Val Tyr Phe Tyr Asp
180 185 190

Pro Thr Thr Leu Met Asn Asp Trp Trp Asp Ala Ser Leu Leu Ser Arg
195 200 205

Thr Phe Glu Val Val Met Ala Ser Asn Met Gly Trp Ala Asp Phe Asp
210 215 220

Leu Val Gln Thr Leu Gln Asn Ser Asp Val Pro Ala Phe Val Thr Phe
225 230 235 240

Gly Lys Tyr Asp Phe Met Val Ser Pro Leu Pro Lys Pro Gly Asn Pro
245 250 255

Val Asp Gly Lys Ala Gly Leu Phe Glu Asp Ile Pro Gly Val Arg Val
260 265 270

Glu Val Phe Glu Lys Ser Gly His Phe Pro Tyr Trp Glu Gln Glu Gln
275 280 285

Glu Phe Ala Arg Arg Tyr Arg Asp Trp Val Ala Thr Leu Pro Glu Ser
290 295 300

Ala Val Arg Ala Ala Glu Ala Met Thr Pro Asn Gly Ile Arg Gln
305 310 315

<210> 4
<211> 960
<212> DNA
<213> Rhodococcus erythropolis

<400> 4
atggctcgcc ccaagagaag gagatctgcc atgccattgg tggttctgag cgacggcaca 60
cgcattcacg tcgaaacttc aggcaacggc gtccctgcgc ttgttccatg cgtgggatcg 120
agcgttccgt tcgagcggac gttcggtgag gaattgaaga cggatattca gtacaacttc 180
gtcgagggtcc gcggtacctc cagggtccgac ggcgaaccga gtgaggtcgc ctcaactcgat 240
cgtatttccg acgacctcga agagggtccgt cagttgttgg gtttgacaa ggtcatcgca 300
ctcggccagt cgcgtaacgg catgatggcc gctcaactacg cgcagaagta tccgaattcg 360
gtcctacacc tggtaacat cggcaccct gcgtcttga gtatgatcaa gaacgaagaa 420
tactggaacg cgttcgaga cgacgagcgt aaacgcctcc gcgctgaaaa cgacgcggcg 480
atggagcgcg aggggtctct cgaccttgac aacctgaata ctgccgaaaa gatcgttcgc 540
ctcttcgatc ttgaaggcgc agtgacttc tacgatccaa cgacactcat gaatgattgg 600
tgggacgctt cacttctcag ccggacattc gaagtcgtca tggcgtcgaa tatgggttgg 660
gcgacttcg acctcgttca aacctgcag aattctgatg tccccgcttt cgtaacgttc 720
ggaaagtacg acttcatggt ctccccgctg ccgaaaccag gaaatccggt tgacggaaaa 780
gccggcctct tcgaagatat tccgggtgtc cgggtagagg tcttcgagaa gagtgggcac 840
ttccccgtatt gggagcagga acaggaattt gctcgcgct atcgcgattg ggtcgcaacc 900
cttccggaat ccgctgtacg cgctgcagaa gctatgacgc ccaatggcat tcggcagtga 960

<210> 5
<211> 316
<212> PRT
<213> Rhodococcus erythropolis

<400> 5

Met Gly Pro Leu Val Val Leu Ser Asp Gly Thr Arg Ile His Val Glu
1 5 10 15

Thr Ser Gly Asn Gly Val Pro Ala Leu Val Pro Cys Val Gly Ser Ser
20 25 30

Val Pro Phe Glu Arg Thr Phe Gly Glu Glu Leu Lys Thr Asp Ile Gln
35 40 45

Tyr Asn Phe Val Glu Val Arg Gly Thr Ser Arg Ser Asp Gly Glu Pro
50 55 60

Ser Glu Val Ala Ser Leu Asp Arg Ile Ser Asp Asp Leu Glu Glu Val
65 70 75 80

Arg Gln Leu Leu Gly Leu Asp Lys Val Ile Ala Leu Gly Gln Ser Arg
85 90 95

Asn Gly Met Met Ala Ala His Tyr Ala Gln Lys Tyr Pro Asn Ser Val
100 105 110

Leu His Leu Val Thr Ile Gly Thr Pro Ala Ser Leu Ser Met Ile Lys
115 120 125

Asn Glu Glu Tyr Trp Asn Ala Phe Ala Asp Asp Glu Arg Lys Arg Leu
130 135 140

Arg Ala Glu Asn Asp Ala Ala Met Glu Arg Glu Gly Leu Leu Asp Leu
145 150 155 160

Asp Asn Leu Asn Thr Ala Glu Lys Ile Val Arg Leu Phe Asp Leu Glu
165 170 175

Gly Ala Val Tyr Phe Tyr Asp Pro Thr Thr Leu Met Asn Asp Trp Trp
180 185 190

Asp Ala Ser Leu Leu Ser Arg Thr Phe Glu Val Val Met Ala Ser Asn
 195 200 205

Met Gly Trp Ala Asp Phe Asp Leu Val Gln Thr Leu Gln Asn Ser Asp
 210 215 220

Val Pro Ala Phe Val Thr Phe Gly Lys Tyr Asp Phe Met Val Ser Pro
 225 230 235 240

Leu Pro Lys Pro Gly Asn Pro Val Asp Gly Lys Ala Gly Leu Phe Glu
 245 250 255

Asp Ile Pro Gly Val Arg Val Glu Val Phe Glu Lys Ser Gly His Phe
 260 265 270

Pro Tyr Trp Glu Gln Glu Gln Glu Phe Ala Arg Arg Tyr Arg Asp Trp
 275 280 285

Val Ala Thr Leu Pro Glu Ser Ala Val Arg Ala Ala Glu Ala Met Thr
 290 295 300

Pro Asn Gly Ile Arg Gln His His His His His His
 305 310 315

<210> 6

<211> 951

<212> DNA

<213> Rhodococcus erythropolis

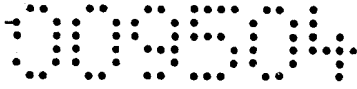
<400> 6

atgggcccac tggtggttct gagcgacggc acacgcattc acgtcgaaac ttcaggcaac 60

ggcgtccctg cgcttggtcc atgcgtggga tcgagcgttc cgttcgagcg gacgttcggt 120

gaggaattga agacggatat tcagtacaac ttcgtcgagg tccgcggtac ctccaggtcc 180

gacggcgaac cgagtggagt cgcctcactc gatcgtattt cgcacgacct cgaagaggtc 240



cgtcagttgt tgggtttgga caaggtcatc gcactcggcc agtcgcgtaa cggcatgatg 300
gccgctcact acgcgcagaa gtatccgaat tcggtcctac acctggtaac catcggcacc 360
cctgctctt tgagtatgat caagaacgaa gaatactgga acgcgttcgc agacgacgag 420
cgtaaacgcc tccgcgctga aaacgacgcg gcgatggagc gcgagggctt cctcgacctt 480
gacaacctga atactgccga aaagatcgtt cgcctcttcg atcttgaagg cgcagtgtac 540
ttctacgatc caacgacact catgaatgat tgggtggagc cttcacttct cagccggaca 600
ttcgaagtcg tcatggcgtc gaatatgggt tgggcagact tcgacctcgt tcaaactctg 660
cagaattctg atgtccccgc tttcgtaacg ttcggaaagt acgacttcat ggtctccccg 720
ctgccgaaac caggaaatcc ggttgacgga aaagccggcc tcttcgaaga tattccgggt 780
gtccgggtag aggtcttcga gaagagtggg cacttcccgt attgggagca ggaacaggaa 840
tttgctcgcc gctatcgca ttgggtcgca acccttccgg aatccgctgt acgcgctgca 900
gaagctatga cgcccaatgg cattcggcag catcaccatc accatcactg a 951

Patentansprüche:

1. Enzyme zur Transformation, insbesondere hydrolytischen Spaltung von Ergopeptinen, dadurch gekennzeichnet, dass die Enzyme Ergopeptide am Cyclolring hydrolytisch spaltende α/β Hydrolasen sind.

2. Enzyme nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Enzyme eine katalytische Triade, bestehend aus einer nukleophilen Aminosäure, aus Histidin und aus einer sauren Aminosäure, aufweisen und dass die Triade in einer Peptidkette mit der Faltung einer α/β Hydrolase enthalten ist.

3. Enzyme nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die katalytische Triade aus der nukleophilen Aminosäure Serin, aus Histidin und aus einer der sauren Aminosäuren Aspartat oder Glutamat besteht und dass die Triade in einer Peptidkette mit der Faltung einer α/β Hydrolase enthalten ist.

4. Enzyme nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die α/β Hydrolase einen nukleophilen Ellbogen mit der Sequenz Gly-Gln-Ser-Arg-Asn-Gly aufweist.

5. Enzyme nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es insbesondere ein Enzym der Sequenz ID Nr. 1 ist.

6. Enzyme nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine von der Sequenz ID Nr. 1 verschiedene N- oder C-terminale Sequenz, insbesondere ein Enzym der Sequenz ID Nr. 3 oder Sequenz ID Nr. 5 ist.

7. Enzyme nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie wenigstens 96 % Sequenzidentität mit der Sequenz ID Nr. 1, insbesondere ein Enzym der Sequenz ID Nr. 3 aufweisen.

8. Verfahren zur enzymatischen Transformation von Ergopeptinen, dadurch gekennzeichnet, dass die Ergopeptide hydrolytisch am Cyclolring zu primären Metaboliten gespalten werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Spaltung durch einen nukleophilen Angriff am C3'-Atom des Cyclolrings erfolgt.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass der nukleophile Angriff am C3'-Atom des Cyclolrings durch eine in einer Peptidkette mit der Faltung einer α/β Hydrolase enthaltenden katalytischen Triade, die aus der nukleophilen Aminosäure Serin, aus Histidin und aus einer der sauren Aminosäuren Aspartat oder Glutamat besteht, erfolgt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8, 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die durch die hydrolytische Spaltung des Cyclolrings der Ergopeptide gebildeten primären Metaboliten weiter umgesetzt werden.

12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Umsetzung der primären Metaboliten durch spontane chemische Reaktion erfolgt.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass bei der weiteren Umsetzung der primären Metaboliten Ergin gebildet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 11, 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Umsetzung der primären Metaboliten durch im Reaktionsmilieu vorkommende Enzyme erfolgt.

15. Verfahren zur Produktion von Ergopeptinen metabolisierenden, insbesondere entgiftenden Enzymen, dadurch gekennzeichnet, dass ein Gen, welches nach einem der Ansprüche 1 bis 7 codiert, in einen Expressionsvektor kloniert wird, in prokaryotische und/oder eukaryotische Wirtszellen transformiert wird und in einer Wirtszelle exprimiert wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, als Gen ein Gen mit der Sequenz ID Nr. 2, 4 oder 6 eingesetzt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Gen in eine Mikroorganismus gewählt aus *Pichia pastoris*, *E. coli* oder *Bacillus subtilis* als Wirtszelle transformiert wird und darin exprimiert wird.

Wien, 9. Oktober 2012

Erber Aktiengesellschaft
durch:
Cunow Patentanwalts KG

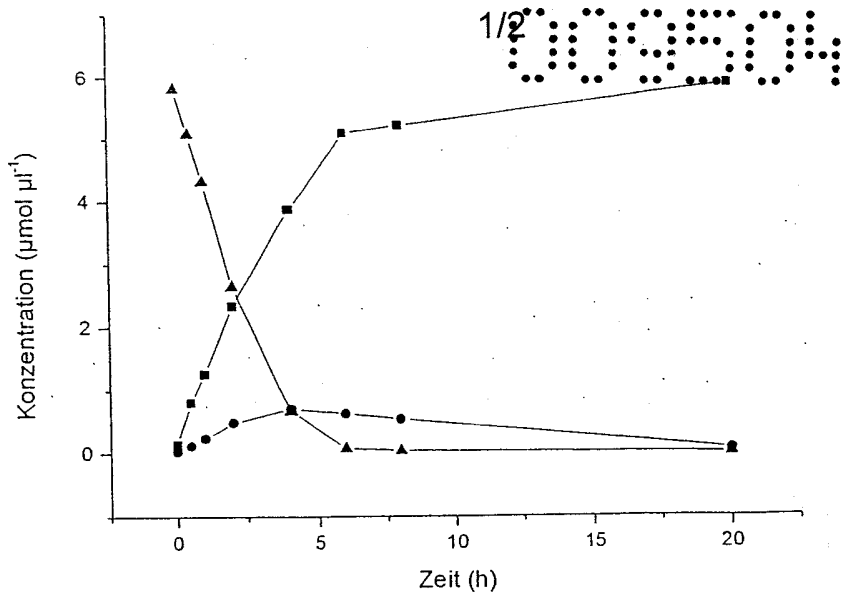


FIG. 1

Umsetzung von Ergotamin durch das Enzym der Sequenz ID Nr. 1 ((▲) Ergotamin); (■) Ergin; (●) Zwischenprodukt

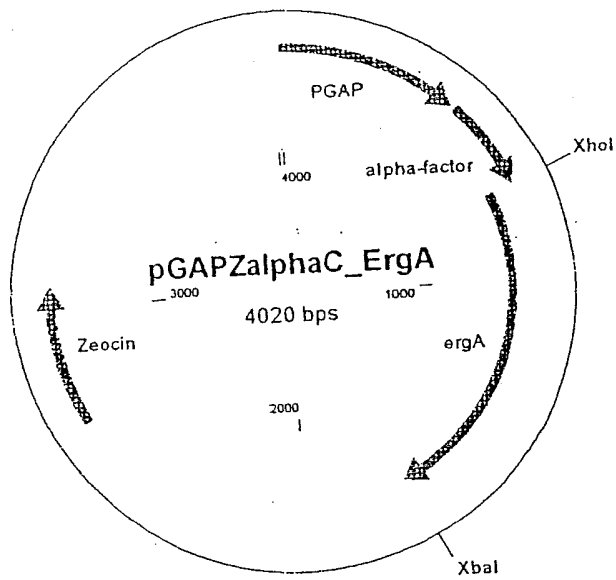


FIG. 3

Darstellung des *P. pastoris* Expressionsvektors pGAPZ alpha C mit dem Gen der Sequenz ID Nr. 2

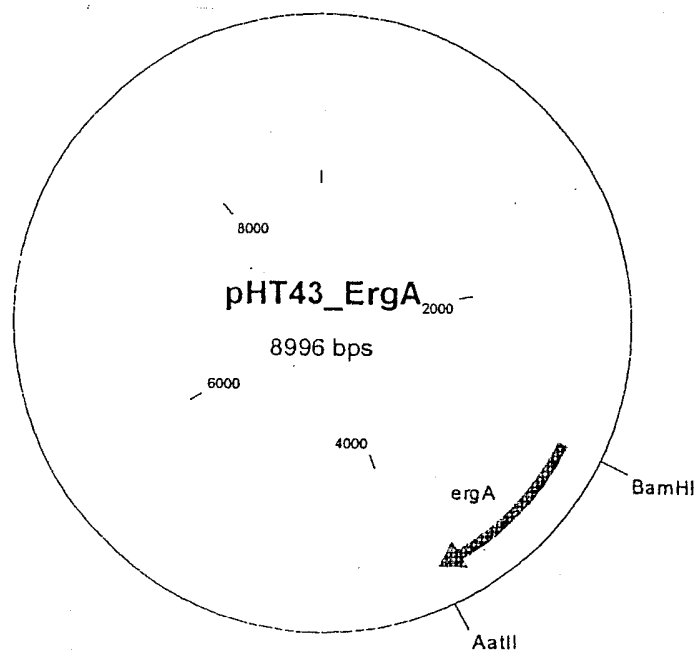
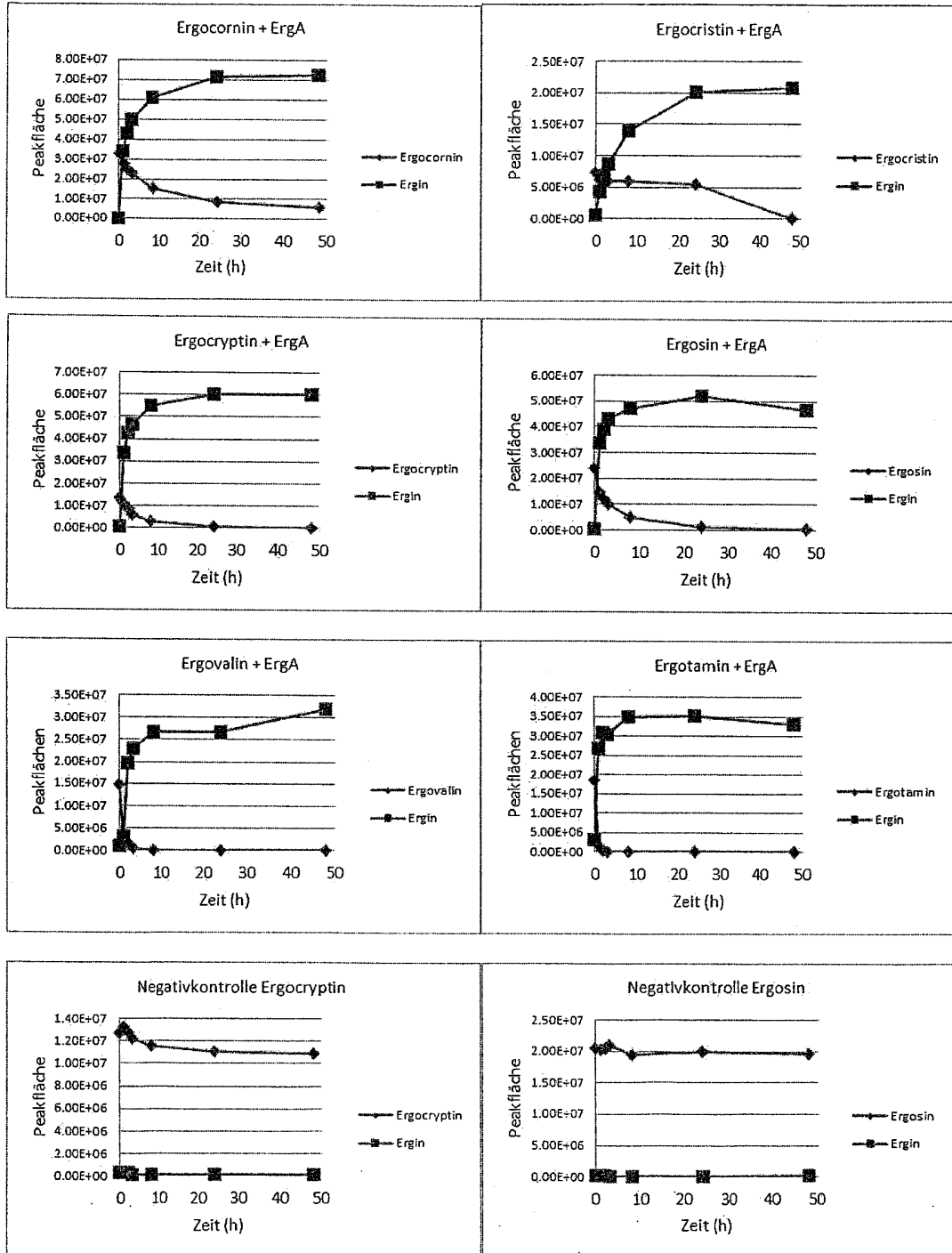


FIG. 4

Darstellung des *B. subtilis* Expressionsvektors pET43 mit dem Gen der Sequenz ID Nr. 2

FIG. 2



Peakflächen (Y-Achse) von LC-MS/MS Analytik der Ergopeptide Ergocornin, Ergocristin, Ergocryptin, Ergosin, Ergovalin und Ergotamin, in Summe mit dem jeweiliger Isomeren, aufgetragen gegen die Inkubationszeit mit oder ohne (Negativkontrollen) dem Enzym der Sequenz ID Nr.1 in Stunden

Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß IPC: C12N 9/14 (2006.01)
Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß CPC: C12N 9/14 (2013.01)
Recherchierter Prüfstoﬀ (Klassifikation): C12N
Konsultierte Online-Datenbank: WPI, EPODOC, Fulltext, CAS, CASREACT, REGISTRY

Dieser Recherchenbericht wurde zu den am **09.10.2012** eingereichten Ansprüchen **1-17** erstellt.

Kategorie ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	Registry Nummer 935953-75-6 [online-Eintrag in STN-Registry Datenbank vom 25.05.2007]	1-5
X	WO 200229042 A2 (MILLENIUUM PHARMACEUTICALS, INC.) 11 April 2002 (11.04.2002) Seite 21, Zeile 15 - Seite 22, Zeile 27	1-3, 15, 17

Datum der Beendigung der Recherche: 31.07.2013	Seite 1 von 1	Prüfer(in): MOSSER Reinhold
---	---------------	--------------------------------

¹⁾ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung : der Anmeldegegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung : der Anmeldegegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist.	A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein „ älteres Recht “ hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.
---	---