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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Januar 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/05982 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C12N 15/55, 11/08, 9/80, C12P 41/00, 13/04

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05586

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. Juni 2000 (17.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 33 362.9 20. Juli 1999 (20.07.1999) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **AVENTIS CROPSCIENCE GMBH** [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **BARTSCH, Klaus** [DE/DE]; Im Kleinfeld 54, D-61462 Königstein (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *Mit internationalem Recherchenbericht.*
— *Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** METHOD FOR THE PRODUCTION OF L-AMINO ACIDS FROM THEIR RACEMIC N-ACETYL-D, L-DERIVATIVES BY ENZYMATIC RACEMATE CLEAVAGE BY MEANS OF ISOLATED RECOMBINANT ENZYMES

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON L-AMINOSÄUREN AUS IHREN RACEMISCHEN N-ACETYL-D,L-DERIVATEN DURCH ENZYMATISCHE RACEMAT-SPALTUNG MITTELS ISOLIERTER, REKOMBINANTER ENZYME

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for the production of proteinogenic or non-proteinogenic L-amino acids, especially L-phosphinothricin, from their racemic N-acetyl-D,L-derivatives. The method is characterized in that: (a) N-acetyl-L-derivatives of the corresponding L-amino acids are selectively deacetylated by enzymatic racemate cleavage by means of isolated recombinant enzymes while the N-acetyl-D-derivatives of the corresponding D-amino acids are not deacetylated and (b) the deacetylated L-amino acids are preparatively separated from the non-deacetylated N-acetyl-D-derivatives and/or the incompletely deacetylated N-acetyl-L-derivatives.

(57) **Zusammenfassung:** Ein Verfahren zur Herstellung von proteinogenen oder nicht-proteinogenen L-Aminosäuren, insbesondere L-Phosphinothricin, aus deren racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten ist dadurch gekennzeichnet, daß (a) durch eine enzymatische Racemat-Spaltung mittels isolierter, rekombinanter Enzyme selektiv N-Acetyl-L-Derivate der korrespondierenden L-Aminosäuren deacetyliert werden, während N-Acetyl-D-Derivate der korrespondierenden D-Aminosäuren nicht deacetyliert werden und (b) die erhaltenen deacetylierten L-Aminosäuren präparativ von den nicht deacetylierten N-Acetyl-D-Derivaten und/oder den nicht vollständig deacetylierten N-Acetyl-L-Derivaten getrennt werden.

WO 01/05982 A1

Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren aus ihren racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten durch enzymatische Racemat-Spaltung mittels isolierter, rekombinanter Enzyme

Die Erzeugung der nicht-proteinogenen Aminosäure L-PPT (L-Phosphinothricin) durch Racemat-Trennung ist bisher mit hoher Reinheit und Ausbeute nur durch Spaltung von Phenacetyl-Phosphinothricin mit Penicillin-G-Acylase aus *Escherichia coli* beschrieben worden (DE-A-3048612). Die Synthese von Phenacetyl-PPT ist aber im Vergleich zu N-Ac-PPT aufwendiger und teurer. Jedoch besitzt Penicillin-G-Acylase keine Spezifität für aliphatische Acylreste und somit auch nicht für N-Ac-PPT. Andere bekannte Acylasen haben ebenfalls keine oder nur geringe Substratspezifität für N-Ac-PPT und wurden bisher nur in mikrobiellen Biotransformationen ohne Aufreinigung der Enzyme eingesetzt (wie z.B. in DE-A-2939269 beschrieben). Dadurch waren nur sehr geringe Raum/Zeit-Ausbeuten erreichbar. Aus der Patentanmeldung EP-A-0382113 ist die L-spezifische Spaltung von N-Ac-PPT Carbonsäureestern durch Acylase I bekannt. Auch dieses Enzym hat jedoch keine Spezifität für die freie Carbonsäure und erfordert deshalb eine Veresterung als zusätzlichen Syntheseschritt bei der Substratbereitstellung.

Die Patentanmeldung DE-A-19652284 beschreibt die gezielte Isolierung von mikrobiellen Deacetylasen aus Bodenproben mit Spezifität für N-Acetyl-Aminosäuren, vorzugsweise N-Acetyl-Phosphinothricin (N-Ac-PPT), sowie die Klonierung der korrespondierenden Gene aus *Stenotrophomonas sp.* und *Comamonas acidovorans.*
Aufgrund der gefundenen Sequenzhomologien und der durchgeführten Substratspezifitätstests konnte gezeigt werden, daß die beschriebenen Deacetylasen zur Gruppe der Hippurat-Hydrolasen (EC 3.5.1.32) gehören, deren natürliches Substrat N-Benzoyl-Glycin, ein Aminosäure-Derivat mit einer aromatischen N-Acylfunktion ist. Daher war es interessant, daß diese Enzyme auch N-acetylierte Aminosäuren, insbesondere N-Acetyl-Phosphinothricin, als Substrat

akzeptieren können, wobei es sich um Aminosäure-Derivate mit aliphatischen N-Acylfunktionen handelt. Aus den Patentanmeldungen DE-A-2939269 und DE-A-2717440 ist bekannt, daß die herbizide Wirkung von racemischem Phosphinothricin allein von dessen L-Enantiomer (L-PPT) ausgeht.
In diesem Zusammenhang war es interessant, daß die gefundenen Deacetylasen ausschließlich die L-Enantiomere von N-Acetyl-PPT, sowie von N-Acetyl-Derivaten einiger proteinogener Aminosäuren mit hoher Spezifität spalten. Daher eignen sich diese Enzyme ausgezeichnet zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere des herbiziden Wirkstoffs L-Phosphinothricin, aus deren racemischen N-Acetyl-Derivaten nach dem Prinzip der Racemat-Spaltung , wie es z.B. in den Patentanmeldungen EP-A-0304021, DE-A-2939269 und DE-A-3048612 beschrieben wird. Wesentliche Nachteile der Verfahren in den drei vorangehend beschriebenen Patentanmeldungen bestehen jedoch darin, daß (1) nur geringe Substratkonzentrationen (ca. 0.5% im Falle der Patentanmeldung DE-A-2939269) eingesetzt werden können, wodurch eine technische Eignung als gering zu bewerten ist, daß (2) mit nicht isolierten Enzymen gearbeitet wird, wodurch sich die Problematik von Nebenreaktionen und anschließender Aufreinigungsschritte nicht oder nur sehr kostenintensiv lösen läßt und daß (3) eine kostenintensive Produktbereitstellung notwendig ist (wie im Falle der Patentanmeldung DE-A-3048612).

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe liegt darin, eine oder mehrere neue Deacetylasen (wie in DE-A-19652284 bereits charakterisiert) in geeigneter Form und Menge zu exprimieren, und es mit Hilfe dieser Enzyme zu ermöglichen, L-PPT sowie einige proteinogene L-Aminosäuren aus den chemisch sehr einfach zugänglichen racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten durch Racemat-Spaltung mit hoher Ausbeute und Enantiomerenreinheit herzustellen.

Für den Fall, daß die enzymatische Aktivität bereits annähernd bekannt ist, und in dem auch bereits eine Klonierung der das Enzym codierenden Nukleinsäuresequenz erfolgt ist, besteht die erste Tätigkeit darin, das entsprechende

Nukleinsäurefragment in einen geeigneten Vektor zu überführen, um dann entweder eine Überproduktion in einem geeigneten Bakterienstamm durchzuführen, und/oder um das Protein nach der Überexpression zu isolieren. Das so isolierte Enzym kann entweder direkt zur enzymatischen Reaktion verwendet werden oder aber über geeignete Kopplungsgruppen an eine Matrix fixiert werden.

Eine erster enzymatischer Test ist empfehlenswert, um die generelle Bestätigung zu erhalten, ob die gewünschte Reaktion abläuft. Alle weiteren Schritte dienen der Parameteroptimierung hinsichtlich der Reaktionsspezifität (bezogen auf Edukt und Produkt), der Reaktionsgeschwindigkeit, der Reaktionseffizienz, der Halbwertszeit des eingesetzten Enzyms, sowie der möglichen Substratkonzentrationen. Für den Fall, daß einzelne Parameter nicht genau den Anforderungen entsprechen, ist man in der Lage, geeignete Veränderungen an der das Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz vorzunehmen, die eine weitere Optimierung des vorhandenen natürlichen Enzyms zur Folge haben.

Die Klonierung einzelner verwendeter Deacetylasen wurde bereits in der Anmeldung DE-A-19652284 beschrieben. Die für die entsprechenden Deacetylasen kodierenden Nukleinsäurefragmente wurden wie im Beispiel 1 weiter unten ausgeführt in die entsprechenenden Expressionsvektoren umkloniert, um somit ein notwendiges Maß an eindeutiger Substratspezifität und die Abwesenheit von Nebenreaktionen sicherzustellen. So konnte in der Anmeldung DE-A-19652284 zwar gezeigt werden, daß N-Acetyl-L-PPT deacetyliert wird, jedoch konnte nicht gezeigt werden, daß N-Acetyl-D-PPT nicht ebenfalls deacetyliert wird. Die ausschließliche Umsetzung von N-Acetyl-L-Aminosäuren und N-Acetyl-L-PPT stellt jedoch eine elementare Vorbedingung für die hier beabsichtige technische Verwendung dar.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von proteinogenen oder nicht-proteinogenen L-Aminosäuren aus deren racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten, dadurch gekennzeichnet, daß

(a) durch eine enzymatische Racemat-Spaltung mittels isolierter, rekombinanter Enzyme selektiv N-Acetyl-L-Derivate der korrespondierenden L-Aminosäuren deacetyliert werden, während N-Acetyl-D-Derivate der korrespondierenden D-Aminosäuren nicht deacetyliert werden

und

(b) die erhaltenen deacetylierten L-Aminosäuren präparativ von den nicht deacetylierten N-Acetyl-D-Derivaten und/oder den nicht vollständig deacetylierten N-Acetyl-L-Derivaten getrennt werden.

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von L-Phosphinothricin (L-PPT) aus N-Acetyl-D,L-Phosphinothricin durch enzymatische Racemat-Spaltung mittels isolierter, rekombinanter Enzyme.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden N-Acetyl-D,L-Derivaten durch enzymatische Racemat-Spaltung.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die enantioselektive Erzeugung einer oder mehrerer L-Aminosäuren aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit einer oder mehreren Deacetylasen aus der Gruppe der Hippurat-Hydrolasen durchgeführt wird, wobei insbesondere die enantioselektive Erzeugung von L-Phosphinothricin, L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit einer oder mehreren Deacetylasen aus der Gruppe der Hippurat-Hydrolasen durchgeführt wird.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die enantioselektive Erzeugung einer oder mehrerer L-Aminosäuren aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit den Enzymen *deac* 1 aus *Stenotrophomonas sp.* und/oder *deac 2* aus *Comamonas acidovorans* (beide

Deacetylasen sind in DE-A-19652284 beschrieben) durchgeführt wird, und hierbei ganz besonders die Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die enantioselektive Erzeugung von L-Phosphinothricin, L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit den Enzymen *deac* 1 aus *Stenotrophomonas sp.* oder/und *deac 2* aus *Comamonas acidovorans* (beide Deacetylasen sind in DE-A-19652284 beschrieben) durchgeführt wird. Beide Enzyme weisen eine signifikante Sequenzhomologie auf, die eine identische oder zumindest ähnliche Funktion bei der Spaltung von N-Acetyl-D,L-Derivaten ergibt.

Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der erzeugten rekombinanten Deacetylasen als Biokatalysatoren, die es erlauben, die entsprechenden Reaktionen mit hohen Substratkonzentrationen und/oder der Erzielung hoher Raum/Zeit-Ausbeuten durchzuführen, insbesondere unter Verwendung der rekombinanten Deacetylasen in immobilisierter Form.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Durchführung der oben beschriebenen Verfahren bei Reaktionstemperaturen von etwa 25°C bis 65°C, bevorzugt bei Reaktionstemperaturen von etwa 30°C bis 45°C und besonders bevorzugt bei Reaktionstemperaturen von etwa 35°C bis 40°C.

Des weiteren betrifft die Erfindung die Durchführung der oben beschriebenen Verfahren bei Substratkonzentrationen von etwa 10 mM bis 1500 mM, bevorzugt bei Substratkonzentrationen größer als 50 mM, besonders bevorzugt bei Substratkonzentrationen größer als 250 mM und ganz besonders bevorzugt bei Substratkonzentrationen größer als 500 mM.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Trennung der mit Hilfe der oben beschriebenen Schritte erzeugten L-Aminosäure oder des L-PTC von den korrespondierenden N-Acetyl-D,L-Derivaten, die entweder - wie im Falle von N-Acetyl-D-Derivat - nicht oder - wie im Falle von N-Acetyl-L-Derivat - nicht vollständig umgesetzt worden sind.

Nutzbare Verfahren sind hierbei die Verwendung der Ionenaustauscherchromatographie an einem sauren Ionenaustauscher oder aber die Extraktion der N-Acetyl-D,L-Derivate mittels eines organischen Lösungsmittels, wie beispielsweise von Methylisobutylketon, wobei die vorangehend erzeugte L-Aminosäure oder das L-PTC in die wäßrige Phase übergeht, aus der es dann durch Trocknung aufkonzentriert wird.

Beispiele:

1. Produktion des *deac*-Enzyms als rekombinantes Protein in *Escherichia coli*:

Das *deac* 1-Strukturgen aus *Stenotrophomonas sp.,* codierend für eine N-Ac-PPT-spezifische Deacetylase, wurde als 1,4-kb BamHI/SalI Fragment (beschrieben in DE-A-19652284) in die *Bam* HI/*Sal* I-Schnittstelle des HisTag-Expressionsvektor pQE30 der Firma Quiagen kloniert [Quiaexpress Kit, Type IV, Katalog Nr. 32149, Stüber et al. (1990), in: Immunological Methods, Lefkovits, I. and Pernis, B., eds., vol. IV, Academic Press, New York, pp. 121-152].
Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden nach Standardprotokollen durchgeführt, wie z.B. bei Ausubel et al. (1995), Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, New York, beschrieben. Das religierte Konstrukt wurde in den vom Hersteller (Qiagen) empfohlenen Bakteriestamm *E. coli* M15 transformiert, und rekombinante Klone wurden auf 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin selektiert. Die Expression von rekombinantem Fusionsprotein wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden 4-5 h nach Induktion abgeerntet und bis zur Aufarbeitung des Proteins bei -20°C aufbewahrt.
Durch SDS/Polyacrylamid-Elektrophorese von Zellaliquots der induzierten Klone konnte das HisTag-*deac*1-Fusionsprotein als zusätzliche Bande von 49-kDa nachgewiesen werden.
Der Nachweis der enzymatischen Aktivität des Deacetylase-Fusionsproteins erfolgte im radioaktiven Assay mit [^{14}C]-N-Acetyl-L-PPT als Substrat. Dazu wurden je 200 µl

der induzierten Kulturen mit 0,5 % Toluol, 0,5 % Ethanol für 30 min. bei 37°C permeabilisiert. Die Zellpellets wurden anschließend in je 25 µl 0,1 mM [^{14}C]-N-Acetyl-L-PPT, 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 7,5 resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur qualitativen Bestimmung des gebildeten [^{14}C]-L-PPT wurden je 5 µl Aliquots der Testansätze durch Dünnschichtchromatographie auf HPTLC-Zellulose-Platten (Merck) mit n-Propanol : 25 % Ammoniak = 3 : 2 als Laufmittel analysiert. Die radioaktiven Banden wurden durch Autoradiographie auf Röntgenfilm sichtbar gemacht.
Zur Quantifizierung der Enzymumsetzung wurden die Testansätze in der Radio-HPLC mit Spherisorb® SAX als Trennsäule gemessen (Laufmittel: 5 mM KH_2PO_4, 10 % Methanol, pH = 1,92, Flußrate: 0,5 ml/min.). Unter diesen Bedingungen eluiert [^{14}C]-L-PPT bei 4,5 min. und [^{14}C]-N-Acetyl-L-PPT bei 6,5 min.
Der Expressionsklon mit der höchsten N-Acetyl-L-PPT-spezifischen Deacetylase-Aktivität produziert das Deacetylase-Protein gemäß einer semiquantitativen Bestimmung mit einem Anteil von ca. 10 % am Gesamtprotein und wurde für die Enzymreinigung und die nachfolgend beschriebenen Biotransformationen verwendet.

2. Reinigung der Deacetylase durch Affinitätschromatographie:

Die Isolierung des Deacetylase-Proteins aus dem nach der im Beispiel 1 beschriebenen Klonierung neu benannten Expressionsstamm pQEDEAC erfolgte nach Quiagen Protokoll (Qiaexpress-Kit) durch Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriacetat-Matrix (Ni-NTA) unter nativen Bedingungen. Dazu wurden 800 ml Kultur des Expressionsstammes pQEDEAC wie in Beispiel 1 beschrieben fermentiert und induziert. Das geerntete Zellpellet (4 g) wurde in 20 ml Lysispuffer resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren wurde das klare Proteinlysat (120 mg Gesamtprotein) mit 4 ml 50 % iger Ni-NTA-Suspension zur Bindung des HisTag-Fusionsproteins versetzt und das Material anschließend auf eine Enzymsäule geladen. Die Affinitätsmatrix wurde mit 10 Volumen Waschpuffer gewaschen und dann mit 4 ml Elutionspuffer eluiert. Zur Überprüfung der

Affinitätsreinigung wurden Aliquots des Zellaufschlusses, der Waschlösungen und des Eluats mittels SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Die Deacetylase-Aktivität der verschiedenen proteinhaltigen Fraktionen wurde mit den in Beispiel 1 beschriebenen radioaktiven Assays bestimmt (Reaktionsansätze: 9 µl Proteinlösung + 1 µl 1 mM [^{14}C]-N-Acetyl-L-PPT, Reaktionsbedingungen: siehe oben). Zur quantitativen Enzymbestimmung wurden die Proteinfraktionen mit 50 mM N-Acetyl-D,L-PPT (9 µl Proteinlösung + 1µl 500 mM N-Acetyl-D,L-PPT) für 30 min. bei 37°C inkubiert. Das entstandene PPT wurde anschließend im Aminosäureanalysator (Biotronic LC 5001) gemessen.
Das Protein im Rohextrakt nach Zellaufschluß hatte eine spezifische Deacetylase-Aktivität von 3 nkat/mg Protein (1 nkat = 1 nmol Substrat/sec.). Aus 800 ml Kultur des Expressionsstammes konnten durch Affinitätschromatographie 10 mg HisTag-*deac*-Fusionsprotein mit einer spezifischen Aktivität von 20 nkat/mg Protein und einer Reinheit von ca. 80 % isoliert werden.

3. Substratspezifität und Stereoselektivität der Deacetylase:

Zur Untersuchung von Substrat- und Stereospezifität des *deac*1-Proteins wurden je 5 µg gereinigtes Enzym in 20 µl Ansätzen in 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 7,5 mit je 25 mM der in Tabelle 1 genannten N-Acetyl-L-Aminosäuren bzw. der entsprechenden D-Enantiomere inkubiert. Zum Vergleich wurde Hippursäure (N-Benzoyl-Glycin), das natürliche Substrat der Deacetylase, eingesetzt. Die Reaktionen wurden für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf Bildung der freien Aminosäuren im Aminosäureanalysator gemessen (Biotronic LC 5001). Tabelle 1 gibt die relativen Deacetylase-Aktivitäten für die L-Enantiomere der verschiedenen Substrate an. Neben Hippursäure und N-Ac-L-PPT spaltet das *deac*1-Enzym auch noch die N-Acetyl-Derivate einer Reihe natürlicher Aminosäuren, insbesondere N-Ac-L-Glutaminsäure, N-Ac-Glycin, N-Ac-L-Histidin, N-Ac-L-Ornithin, N-Ac-L-Leucin, N-Ac-L-Glutamin und N-Ac-L-Phenylalanin. In allen Fällen war das Enzym ausschließlich mit den L-Enantiomeren aktiv, während die entsprechenden D-Verbindungen in keinem Fall umgesetzt werden konnten. In allen anderen

getesteten Fällen (siehe Tabelle 1) fand die Umsetzung der N-Acetyl-L-Derivate nur in einem sehr geringen Maß oder aber überhaupt nicht statt.

Tabelle 1: Substratspezifität des *deac*-Enzyms

Substrat[1]	Rel. Aktivität[2] [%]
Hippursäure (N-Benzoyl-Glycin)	100
N-Ac-L-Phosphinothricin	43
N-Ac-L-Ornithin	37
N-Ac-L-Methionin	0
N-Ac-L-Tryptophan	0,4
N-Ac-L-Phenylalanin	24
N-Ac-L-Tyrosin	11
N-Ac-L-Glutaminsäure	100
N-Ac-L-Glutamin	30
N-Ac-Glycin	59
N-Ac-L-Histidin	43
N-Ac-L-Leucin	33
N-Ac-L-Valin	2
N-Ac-L-Serin	4
N-Ac-L-Prolin	0

[1]: Bei allen Verbindungen handelt es sich um die L-Enantiomere

[2]: Die mit Hippursäure gemessene spezifische Aktivität [nmol Glycin/min./mg Protein] wurde gleich 100 % gesetzt, und die anderen Werte wurden darauf bezogen

4. Racemat-Spaltung von N-Acetyl-D,L-Phosphinothricin durch Biotransformation mit Zellen des *deac*-Produzentenstammes:

Eine 400 ml Kultur des Expressionsstammes pQEDEAC wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, fermentiert und induziert. Die geernteten Zellen wurden anschließend in 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 7,5 gewaschen und über Nacht lyophilisiert. Die so behandelten Zellen konnten über mehrere Wochen bei 4°C unter Beibehaltung einer hohen spezifischen Deacetylase-Aktivität gelagert werden und dienten in den folgenden Versuchen als Biokatalysator.
2 mg der lyophilisierten Zellen wurden in 1 ml der folgenden Substratlösungen variierender Konzentrationen resuspendiert:

(1) 10 mM N-Acetyl-D,L-PPT, Dinatrium-Salz (0,3 %)
(2) 50 mM " " (1,3 %)
(3) 100 mM " " (2,6 %)
(4) 250 mM " " (6,7 %)
(5) 500 mM " " (13,3 %)

Die Ansätze enthielten als Reaktionspuffer 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 8,0 und wurden für 48 h auf dem Schüttler bei 100 rpm und 37°C inkubiert. Das bei der Hydrolyse-Reaktion gebildete freie PPT wurde im Aminosäureanalysator (Biotronic LC 5001) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Enantiomerenreinheit des Reaktionsproduktes wurde durch chirale HPLC mit der Trennsäule Chirex® (D) Penicillamin (Phenomenex) analysiert. Als Laufmittel wurde 2 mM $CuSO_4$, 10 % Methanol mit einer Flußrate von 0,5 ml/min. verwendet. Die Detektion erfolgt photometrisch bei 254 nm. Unter diesen Bedingungen eluieren Referenzlösungen von L-PPT bei 17 min. und D-PPT bei 21 min. In allen Testproben konnte ausschließlich L-PPT als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden. Die erzielten Konversionsraten [produziertes L-PPT/N-Acetyl-L-PPT im Substrat x 100]

lagen zwischen 100 % bei den niedrigen Substratkonzentrationen (10 mM, 50 mM) und 66 % bei der höchsten verwendeten Substratkonzentration (500 mM).

Tabelle 2: Racemat-Spaltung von N-Acetyl-D,L-PPT in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Substratlösung N-Acetyl-D,L-PPT [mM]	Produktlösung* L-PPT [mM]	Konversionsrate L-PPT/N-Acetyl-D,L-PPT in %
10	5	100
50	25	100
100	48	96
250	108	86
500	164	66

*: Konzentration an Biokatalysator: 2 mg/ml

Im folgenden Versuch wurde die Konzentration an Biokatalysator erhöht und eine Reaktionskinetik der Substratspaltung aufgenommen. 13 mg der lyophilisierten Zellen wurden in 1 ml Substratlösung, bestehend aus 500 mM N-Acetyl-D,L-PPT, Dinatrium Salz (13,3 % w|v), 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 8,0 resuspendiert und auf einem Schüttler bei 100 rpm und 37°C inkubiert. Zur Bestimmung des gebildeten L-PPT wurden über einen Zeitraum von 55 h je 50 µl Aliquots aus dem Reaktionsansatz abgenommen, zentrifugiert und die Überstände bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Die quantitative Analyse des Reaktionsproduktes L-PPT, sowie die Bestimmung der Enantiomerenreinheit wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Unter den gewählten Bedingungen war die L-spezifische Substrat-Spaltung nach ca. 55 h abgeschlossen. Dabei wurden eine Konversionsrate von ca. 90 % und eine Raum/Zeit-Ausbeute von 483 [mg L-PPT/g Biokatalysator/h] erreicht.

Tabelle 3: Reaktionskinetik der Racemat-Spaltung von N-Acetyl-D,L-PPT

Reaktionszeit [h]	L-PPT [mM]*
0	0
1	27,7
4	59,7
9	106,0
23	181,6
31	186,5
47	208,6
55	221,8

*: Konzentration an Biokatalysator: 13 mg/ml
Substratkonzentration: 500 mM N-Acetyl-D,L-PPT

5. Immobilisierung des gereinigten *deac*-Proteins:

Um die Enzymreaktion mit dem isolierten *deac*-Protein durchführen zu können, wurde das in Beispiel 2 als HisTag-Fusionsprotein gereinigte Enzym an den Polymer-Träger VINA-Epoxy Biosynth® (Riedel de Haen) immobilisiert. Dazu wurde das *deac*-Protein durch Ammoniumsulfat-Fällung auf 15 mg/ml aufkonzentriert und über Nacht gegen 1 M NaPhosphat, pH = 8,0 dialysiert. Für eine Standard-Kopplungsreaktion wurden 10 mg des Proteins mit 100 mg VINA-Träger für 2 Tage bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Anschließend wurde das Immobilisat abzentrifugiert und je 1x in Immobilisierungspuffer, sowie in 50 mM NaPhosphat, pH = 7,0 gewaschen. Zum Blocken freier Epoxy-Gruppen wurde der Träger dann für 1 h bei Raumtemperatur mit 50 mM NaPhosphat, pH = 7,0, 50 mM 2-Mercaptoethanol inkubiert. Der Biokatalysator wurde danach in 1ml 5 mM NaPhosphat, pH = 7,0, 0,02 % NaAzid bei 4°C gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkopplung wurde der Proteingehalt der Lösung vor und nach Immobilisierung, sowie in den Waschlösungen mit Hilfe der Bradford Methode bestimmt [Bradford (1976), Anal. Biochem. 72: 248-254]. Die spezifische Aktivität der Deacetylase wurde

vor und nach Immobilisierung mit dem in Beispiel 1 beschriebenen radioaktiven Assay gemessen. Die relative Enzymaktivität war nach Kopplung > 90 % des für das gelöste Protein bestimmten Wertes.

6. Racemat-Spaltung von N-Acetyl-D,L-Phosphinothricin mit immobilisiertem *deac*-Enzym im Säulenreaktor:

I g Enzym-Immobilisat (Feuchtgewicht) wurde in einen Säulenreaktor geladen und als Biokatalysator für die Racemat-Spaltung von verschieden konzentrierten Substratlösungen mit verschiedenen Flußraten benutzt. Die Substratlösungen enthielten die in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen an N-Acetyl-D,L-PPT, Diammoniumsalz in 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 8,0. Die Reaktionen wurden bei 37°C über insgesamt 10 Tage durchgeführt. Die Umsetzungen wurden durch Bestimmung des im Säulendurchfluß vorhandenen L-PPT mittels Aminosäureanalyse und chiraler HPLC quantifiziert (siehe Beispiel 4). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Die höchste Konversionsrate von 83 % wurde mit der höchsten Substratkonzentration (500 mM) und dem niedrigsten Substratfluß (0,03 ml/min.) erreicht. Die Raum/Zeit-Ausbeute stieg mit der Flußrate und der Substratkonzentration an und erreichte den höchsten Wert von 181 [mg L-PPT/g Biokatalysator/h] bei einer Substratkonzentration von 500 mM und einem Fluß von 0,3 ml/min. Die immobilisierte Deacetylase zeigte über den gesamten Versuchszeitraum eine gute Stabilität und besaß nach 10 Tagen bei 37°C noch ca. 80 % der Ausgangsaktivität.

Tabelle 4: Racemat-Spaltung von N-Acetyl-D,L-PPT mit immobilisiertem *deac*-Enzym im Säulenreaktor

Substratlösung N-Acetyl-D,L-PPT [mM]	Flußrate [ml/min.]	Produktlösung L-PPT [mM]	Konversionsrate [%]	Raum/Zeit-Ausbeute [mg L-PPT/g Biokatalysator/h]*
100	0,1	29,7	59	39
	0,3	22,0	44	87
	0,5	13,8	28	91
250	0,1	38,4	31	50
	0,3	25,0	20	99
	0,5	18,1	14	119
500	0,1	71,1	28	93
	0,3	46,0	18	181
	0,5	26,3	11	173
500	0,03	208,2	83	82

*: Reaktionen bei 37°C

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von proteinogenen oder nicht-proteinogenen L-Aminosäuren aus deren racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten, dadurch gekennzeichnet, daß

   (a) durch eine enzymatische Racemat-Spaltung mittels isolierter, rekombinanter Enzyme selektiv N-Acetyl-L-Derivate der korrespondierenden L-Aminosäuren deacetyliert werden, während N-Acetyl-D-Derivate der korrespondierenden D-Aminosäuren nicht deacetyliert werden

   und

   (b) die erhaltenen deacetylierten L-Aminosäuren präparativ von den nicht deacetylierten N-Acetyl-D-Derivaten und/oder den nicht vollständig deacetylierten N-Acetyl-L-Derivaten getrennt werden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von L-Phosphinothricin (L-PPT) aus N-Acetyl-D,L-Phosphinothricin.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden N-Acetyl-D,L-Derivaten.

4. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die enantioselektive Erzeugung einer oder mehrerer L-Aminosäuren aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit einer oder mehreren Deacetylasen aus der Gruppe der Hippurat-Hydrolasen durchgeführt wird.

5. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die enantioselektive Erzeugung von L-Phosphinothricin, L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin

aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit einer oder mehreren Deacetylasen aus der Gruppe der Hippurat-Hydrolasen durchgeführt wird.

6. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet , daß die enantioselektive Erzeugung einer oder mehrerer L-Aminosäuren aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit den Enzymen *deac* 1 aus *Stenotrophomonas sp.* und/oder *deac 2* aus *Comamonas acidovorans* durchgeführt wird.

7. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet , daß die enantioselektive Erzeugung von L-Phosphinothricin, L- Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit den Enzymen *deac* 1 aus *Stenotrophomonas sp.* und/oder *deac 2* aus *Comamonas acidovorans* durchgeführt wird.

8. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 7, wobei die erzeugten rekombinanten Deacetylasen in immobilisierter Form eingesetzt werden.

9. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 8, wobei die Reaktionstemperaturen etwa 25°C bis 65°C betragen.

10. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 8, wobei das Substrat in einer Konzentration von etwa 10 bis 1500 mM vorliegt.

11. Verwendung von einer oder mehreren Hippurat-Hydrolasen zur enantioselektiven Erzeugung einer oder mehrerer L-Aminosäuren aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten.

12. Verwendung von einer oder mehreren Hippurat-Hydrolasen zur enantioselektiven Erzeugung von L-Phosphinothricin, L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten.

13. Verwendung von *deac* 1 aus *Stenotrophomonas sp.* und/oder *deac 2* aus *Comamonas acidovorans* zur enantioselektiven Erzeugung einer oder mehrerer L-Aminosäuren aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten.

14. Verwendung von *deac* 1 aus *Stenotrophomonas sp.* und/oder *deac 2* aus *Comamonas acidovorans* zur enantioselektiven Erzeugung von L-Phosphinothricin, L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin, L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int tional Application No
PCT/EP 00/05586

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/55 C12N11/08 C12N9/80 C12P41/00 C12P13/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C12P

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 43 08 061 A (HOECHST AG) 15 September 1994 (1994-09-15)	1-5,8-12
Y	page 2, line 17 - line 30; claims 1-11 page 2, line 63 - line 66	6,7,13, 14
X	WO 98 27201 A (BARTSCH KLAUS ;BROER INGE (DE); KRIETE GUIDO (DE); PUEHLER ALFRED) 25 June 1998 (1998-06-25)	1-14
Y	page 1 page 4 page 13, last paragraph table 3	6,7,13, 14

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 November 2000	22/11/2000

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	van Klompenburg, W

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int tional Application No
PCT/EP 00/05586

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 358 428 A (NISSAN CHEMICAL IND LTD) 14 March 1990 (1990-03-14) page 2, line 46 -page 3, line 19 claims 1-10; figures 1-3; examples 1-8,10,11,14	1-5,8-12
X	GB 2 031 896 A (MEIJI SEIKA KAISHA) 30 April 1980 (1980-04-30) claims 1-16; examples 4,5	1,2,4,5, 8-12
X	WO 97 41214 A (CIBA GEIGY AG ;GHISALBA ORESTE (CH); KITTELMANN MATTHIAS (DE); LAU) 6 November 1997 (1997-11-06) claims 1-36	1,11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int tional Application No
PCT/EP 00/05586

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4308061 A	15-09-1994	NONE	
WO 9827201 A	25-06-1998	DE 19652284 A	18-06-1998
		AU 5753598 A	15-07-1998
		BR 9714513 A	21-03-2000
		CZ 9902166 A	13-10-1999
		EP 0942965 A	22-09-1999
		PL 334530 A	28-02-2000
EP 0358428 A	14-03-1990	AT 121789 T	15-05-1995
		DE 68922357 D	01-06-1995
		DE 68922357 T	11-01-1996
		JP 3094696 A	19-04-1991
		US 5081024 A	14-01-1992
GB 2031896 A	30-04-1980	JP 1440990 C	30-05-1988
		JP 55047630 A	04-04-1980
		JP 62047520 B	08-10-1987
		DE 2939269 A	30-04-1980
		FR 2438054 A	30-04-1980
WO 9741214 A	06-11-1997	AU 2697297 A	19-11-1997
		CA 2252616 A	06-11-1997
		EP 0954571 A	10-11-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Ir. ationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/05586

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/55 C12N11/08 C12N9/80 C12P41/00 C12P13/04

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N C12P

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

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 43 08 061 A (HOECHST AG) 15. September 1994 (1994-09-15)	1-5,8-12
Y	Seite 2, Zeile 17 - Zeile 30; Ansprüche 1-11 Seite 2, Zeile 63 - Zeile 66 ---	6,7,13, 14
X	WO 98 27201 A (BARTSCH KLAUS ;BROER INGE (DE); KRIETE GUIDO (DE); PUEHLER ALFRED) 25. Juni 1998 (1998-06-25)	1-14
Y	Seite 1 Seite 4 Seite 13, letzter Absatz Tabelle 3 --- -/--	6,7,13, 14

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
16. November 2000	22/11/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Bevollmächtigter Bediensteter van Klompenburg, W

2

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/05586

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 358 428 A (NISSAN CHEMICAL IND LTD) 14. März 1990 (1990-03-14) Seite 2, Zeile 46 -Seite 3, Zeile 19 Ansprüche 1-10; Abbildungen 1-3; Beispiele 1-8,10,11,14	1-5,8-12
X	GB 2 031 896 A (MEIJI SEIKA KAISHA) 30. April 1980 (1980-04-30) Ansprüche 1-16; Beispiele 4,5	1,2,4,5, 8-12
X	WO 97 41214 A (CIBA GEIGY AG ;GHISALBA ORESTE (CH); KITTELMANN MATTHIAS (DE); LAU) 6. November 1997 (1997-11-06) Ansprüche 1-36	1,11

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In tionales Aktenzeichen
PCT/EP 00/05586

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 4308061	A	15-09-1994	KEINE		
WO 9827201	A	25-06-1998	DE	19652284 A	18-06-1998
			AU	5753598 A	15-07-1998
			BR	9714513 A	21-03-2000
			CZ	9902166 A	13-10-1999
			EP	0942965 A	22-09-1999
			PL	334530 A	28-02-2000
EP 0358428	A	14-03-1990	AT	121789 T	15-05-1995
			DE	68922357 D	01-06-1995
			DE	68922357 T	11-01-1996
			JP	3094696 A	19-04-1991
			US	5081024 A	14-01-1992
GB 2031896	A	30-04-1980	JP	1440990 C	30-05-1988
			JP	55047630 A	04-04-1980
			JP	62047520 B	08-10-1987
			DE	2939269 A	30-04-1980
			FR	2438054 A	30-04-1980
WO 9741214	A	06-11-1997	AU	2697297 A	19-11-1997
			CA	2252616 A	06-11-1997
			EP	0954571 A	10-11-1999