

(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
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/07574 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/53, 15/70, 9/02, 1/21, C12P 7/42 // (C12N 1/21, C12R 1:19)
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07252
- (72) Erfinder; und
- (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Juli 2000 (27.07.2000)
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstrasse 1, D-67056 Fussgönheim (DE). PLEISS, Juergen [DE/DE]; Ostlandstrasse 13, D-71679 Asperg (DE). SCHWANEBERG, Ulrich [DE/DE]; Umlandstrasse 15, D-71336 Waiblingen (DE). SCHMITT, Jutta [DE/DE]; Fuggerstrasse 19, D-70563 Stuttgart (DE). FISCHER, Markus [DE/DE]; Umlandstrasse 14, D-71638 Ludwigsburg (DE). SCHMID, Rolf [DE/DE]; Sylvanerweg 6, D-70329 Stuttgart (DE). LI, Qing-shan [JP/JP]; Kitashirakawa-oiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502 (JP).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
- | | | |
|--------------|----------------------------|----|
| 199 35 115.5 | 27. Juli 1999 (27.07.1999) | DE |
| 100 11 723.6 | 10. März 2000 (10.03.2000) | DE |

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MODIFIED CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASES

(54) Bezeichnung: MODIFIZIERTE CYTOCHROM P450-MONOOXYGENASEN

(57) Abstract: The invention relates to modified cytochrome P450 monooxygenases comprising a modified substrate profile, to nucleic acid sequences that code therefor, to expression constructs and vectors, and to recombinant microorganisms which contain these vectors. The invention also relates to methods for microbiologically producing terminally or subterminally hydroxylated aliphatic carboxylic acids.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft modifizierte Cytochrom P450-Monooxygenasen mit verändertem Substratprofil, dafür kodierende Nukleinsäuresequenzen, Expressionskonstrukte und Vektoren, rekombinante Mikroorganismen, welche diese Vektoren enthalten sowie Verfahren zur mikrobiologischen Herstellung terminal oder subterminal hydroxylierter aliphatischer Carbonsäuren.



WO 01/07574 A3



(74) **Anwälte:** KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter, Kinzebach & Partner, D-81679 München, Sternwartstrasse 4 (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AU, CA, CN, JP, NO, US.

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

9. August 2001

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No
PCT/EP 00/07252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N15/70 C12N9/02 C12N1/21 C12P7/42
//(C12N1/21,C12R1:19)

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)

WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MAVES SHELLEY A ET AL: "Decreased substrate affinity upon alteration of the substrate-docking region in cytochrome P450-BM-3." FEBS LETTERS, vol. 414, no. 2, 1997, pages 213-218, XP002155913 ISSN: 0014-5793 the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>1-3, 7-12,16, 17</p>

Further documents are listed in the continuation of box C.

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

19 December 2000

Date of mailing of the international search report

14.03.01

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

HORNIG H.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No PCT/EP 00/07252
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GRAHAM-LORENCE SANDRA ET AL: "An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxygenase." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 2, 1997, pages 1127-1135, XP002155914 ISSN: 0021-9258 the whole document</p>	1-3, 7-13,16, 17
X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>TRUAN GILLES ET AL: "Thr268 in substrate binding and catalysis in P450BM-3." ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 349, no. 1, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 53-64, XP002155915 ISSN: 0003-9861 the whole document</p>	1,2,7-11
X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>YEOM HYEYEONG ET AL: "The role of Thr268 in oxygen activation of cytochrome P450-BM-3." BIOCHEMISTRY, vol. 34, no. 45, 1995, pages 14733-14740, XP002155916 ISSN: 0006-2960 the whole document</p>	1,2,7-11
X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>KLEIN M L ET AL: "CRITICAL RESIDUES INVOLVED IN FMN BINDING AND CATALYTIC ACTIVITY IN CYTOCHROME P450BM-3" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 268, no. 10, 5 April 1993 (1993-04-05), pages 7553-7561, XP000565661 ISSN: 0021-9258 the whole document</p>	1,2,7-11
X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>GB 2 294 692 A (BRITISH GAS PLC) 8 May 1996 (1996-05-08) the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,7-11
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No
PCT/EP 00/07252

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SCHWANEBERG U ET AL: "P450 monooxygenase in biotechnology - I. Single-step, large-scale purification method for cytochrome P450 BM-3 by anion-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, vol. 848, no. 1-2, 2 July 1999 (1999-07-02), pages 149-159, XP004172008 ISSN: 0021-9673 the whole document</p>	
P,X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>WO 00 31273 A (BELL STEPHEN GRAHAM ;CARMICHAEL ANGUS BISHOP (GB); WONG LUET LOK () 2 June 2000 (2000-06-02) claims 1-20</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-3,7-11

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims Nos. 1, 2 (in full), 3, 6-13, 15-17 (in part)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1, 2 (in full) 3, 6-13, 15-17 (in part)

Modified cytochrome P450 monooxygenase which, due to the site-specific mutagenesis of the substrate-binding area thereof, exhibits, in comparison to the wild type, a modified substrate profile during the terminal and/or subterminal enzymatic hydroxylation of aliphatic carboxylic acids;
said enzyme derived from cytochrome P450 monooxygenases of bacterial origin; said enzyme derived from *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2, which comprises at least one functional mutation in one of the following amino acid sequence domains: 24-28, 45-51, 70-72, 73-82, 86-88, 172-224 and 352-356, with the provision that more than one of these domains is mutated when the enzyme carries the mutation F87A; said monooxygenase characterized in that it exhibits a single V26T amino acid substitution; nucleic acid that codes for said monooxygenase; expression construct containing said nucleic acid; vector comprising said expression product; recombinant microorganism that is transformed with at least one said vector; said microorganism which is selected among bacteria of the genus *Escherichia*; method for preparing terminal or subterminal hydroxylated aliphatic carboxylic acids using said monooxygenase that is characterized by a single V26T amino acid substitution; said method which is characterized in that a C8-C30 monocarboxylic acid or a derivative thereof is used as a hydroxylatable carboxylic acid; said method which is characterized in that the reaction is carried out in the presence of an electron donor or reduction equivalent selected among NADH, NADPH and Zn/Co(III)sepulchrate.

2. Claims Nos. 3, 6-13, 16, 17 (in part)

As in Invention No. 1, but limited to a monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and with a single amino acid substitution R47R.

3. Claims Nos. 3, 6-13, 15-17 (in part)

As in Invention No. 1, but limited to a monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and with a single amino acid substitution S72G.

4. Claims Nos. 3, 6-13, 15-17 (in part)

As in Invention No. 1, but limited to a monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and with a single amino acid substitution A74G.

5. Claims Nos. 3, 6-13, 15-17 (in part)

As in Invention No. 1, but limited to a monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and with a single amino acid substitution F87V.

6. Claims Nos. 3, 6-13, 16, 17 (in part)

As in Invention No. 1, but limited to a monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and with a single amino acid substitution L188z, wherein z represents an amino acid selected among K, R, W, Q, N, G, A and S.

7. Claims Nos. 3, 6-13, 15-17 (in part)

As in Invention No. 1, but limited to a monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and with a single amino acid substitution M354T.

8. Claims Nos. 3-5, 7-14, 16, 17 (in part)

Monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and each containing at least one functional mutation in the amino acid domains 86-88 and 172-224; said monooxygenase characterized in that it has an amino acid substitution mutant F87V; nucleic acid that codes for said monooxygenase; expression construct that contains said nucleic acid; vector that comprises said expression product; recombinant microorganism that is transformed with at least one said vector; said microorganism selected among bacteria of the genus *Escherichia*; method for preparing terminal or subterminal hydroxylated aliphatic carboxylic acids using said monooxygenase that is characterized by a functional mutation in amino acid domains 86-88 and 172-224, whereby one amino acid substitution mutante must be F87V; said method which is characterized in that a C8-C30 monocarboxylic acid or a derivative thereof is used as a hydroxylatable carboxylic acid; said method which is characterized in that the reaction is carried out in the presence of an electron donor or reduction equivalent selected among NADH, NADPH and Zn/Co(III)sepulchrate.

9. Claims Nos. 3-5, 7-14, 16, 17 (in part)

As in Invention No. 8, but limited to monooxygenases of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and each containing at least one functional mutation in amino acid domains 86-88 and 172-224, whereby the monooxygenases have the amino acid substitution pattern F87A, L188K or F87V, L188K.

10. Claims Nos. 3-5, 7-14, 16, 17 (in part)

As in Invention No. 8, but limited to monooxygenases of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and each containing at least one functional mutation in amino acid domains 86-88 and 172-224, whereby the monooxygenases have the amino acid substitution pattern F87A, L188K, A74G or F87V, L188K, A74G.

11. Claims Nos. 3-5, 7-17 (in part)

As in Invention No. 8, but limited to monooxygenases of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and each containing at least one functional mutation in amino acid domains 86-88 and 172-224, whereby the monooxygenases have the amino acid substitution pattern F87A, L188K, A74G, R47F or F87V, L188K, A74G, R47F.

12. Claims Nos. 3-5, 7-17 (in part)

As in Invention No. 8, but limited to monooxygenases of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and each containing at least one functional mutation in amino acid domains 86-88 and 172-224, whereby the monooxygenases have the amino acid substitution pattern F87A, L188K, A74G, R47F, V26T or F87V, L188K, A74G, R47F, V26T.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07252

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2294692 A	08-05-1996	AU 705736 B	03-06-1999
		AU 3811795 A	31-05-1996
		CN 1171818 A	28-01-1998
		CZ 9701277 A	15-10-1997
		EP 0789770 A	20-08-1997
		WO 9614419 A	17-05-1996
		JP 10503658 T	07-04-1998
		KR 234348 B	15-12-1999
		NZ 294904 A	24-09-1998
		PL 319970 A	01-09-1997
		RU 2133774 C	27-07-1999
		SK 54597 A	04-02-1998
		US 6100074 A	08-08-2000

WO 0031273 A	02-06-2000	AU 1281900 A	13-06-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern des Aktenzeichen

PCT/EP 00/07252

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N15/70 C12N9/02 C12N1/21 C12P7/42
 //(C12N1/21,C12R1:19)

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)

WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------------------	--	--------------------

X	<p>MAVES SHELLEY A ET AL: "Decreased substrate affinity upon alteration of the substrate-docking region in cytochrome P450-BM-3." FEBS LETTERS, Bd. 414, Nr. 2, 1997, Seiten 213-218, XP002155913 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-3, 7-12,16, 17</p>
---	--	---

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

^o 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

19. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14.03.01

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

HORNIG H.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/EP 00/07252

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>GRAHAM-LORENCE SANDRA ET AL: "An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxygenase." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 272, Nr. 2, 1997, Seiten 1127-1135, XP002155914 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument</p>	1-3, 7-13,16, 17
X	<p>--- TRUAN GILLES ET AL: "Thr268 in substrate binding and catalysis in P450BM-3." ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, Bd. 349, Nr. 1, 1. Januar 1998 (1998-01-01), Seiten 53-64, XP002155915 ISSN: 0003-9861 das ganze Dokument</p>	1,2,7-11
X	<p>--- YEOM HYEYEONG ET AL: "The role of Thr268 in oxygen activation of cytochrome P450-BM-3." BIOCHEMISTRY, Bd. 34, Nr. 45, 1995, Seiten 14733-14740, XP002155916 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument</p>	1,2,7-11
X	<p>--- KLEIN M L ET AL: "CRITICAL RESIDUES INVOLVED IN FMN BINDING AND CATALYTIC ACTIVITY IN CYTOCHROME P450BM-3" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, Bd. 268, Nr. 10, 5. April 1993 (1993-04-05), Seiten 7553-7561, XP000565661 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument</p>	1,2,7-11
X	<p>--- GB 2 294 692 A (BRITISH GAS PLC) 8. Mai 1996 (1996-05-08) das ganze Dokument</p>	1,2,7-11

	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 00/07252

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SCHWANEBERG U ET AL: "P450 monooxygenase in biotechnology - I. Single-step, large-scale purification method for cytochrome P450 BM-3 by anion-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, Bd. 848, Nr. 1-2, 2. Juli 1999 (1999-07-02), Seiten 149-159, XP004172008 ISSN: 0021-9673 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
P,X	<p>WO 00 31273 A (BELL STEPHEN GRAHAM ;CARMICHAEL ANGUS BISHOP (GB); WONG LUET LOK () 2. Juni 2000 (2000-06-02) Ansprüche 1-20</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-3,7-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/07252

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Ansprüche 1, 2 komplett, 3, 6-13, 15-17 partiell.

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: (1,2)-komplett, (3,6-13,15-17)-partiell

Modifizierte Cytochrom P450 Monooxygenase, welche durch ortsspezifische Mutagenese ihres Substrat-bindenden Bereichs im Vergleich zum Wildtyp ein verändertes Substratprofil bei der terminalen und/oder subterminalen enzymatischen Hydroxylierung von aliphatischen Carbonsäuren zeigt; besagtes Enzym, abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs; besagtes Enzym, abgeleitet von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.2, welches wenigstens in eine funktionelle Mutation in einem der folgenden Aminosäuresequenzbereiche aufweist: 24-28, 45-51, 70-72, 73-82, 86-88, 172-224; und 352-356, mit der Massgabe, dass mehr als eine dieser Bereiche mutiert ist, wenn das Enzym die Mutation F87A trägt; besagte Monooxygenase, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine einzelne V26T Aminosäuresubstitution aufweist; Nukleinsäure kodierend für besagte Monooxygenase; Expressionskonstrukt, enthaltend besagte Nukleinsäure; Vektor, umfassend besagtes Expressionsprodukt; Rekombinierter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem besagten Vektor; besagter Mikroorganismus, ausgewählt unter Bakterien der Gattung *Escherichia*; Verfahren zur Herstellung von terminal oder subterminal hydroxylierten aliphatischen Carbonsäuren mittels besagter Monooxygenase, gekennzeichnet durch eine einzelne V26T Aminosäuresubstitution; besagtes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C8-C30-Monocarbonsäure oder ein Derivat davon einsetzt; besagtes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion in Gegenwart eines Elektronendonors oder Reduktionsäquivalent, ausgewählt unter NADH, NADPH und Zn/Co(III)sepulchrat, durchführt.

2. Ansprüche: (3,6-13,16,17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution R47F;

3. Ansprüche: (3,6-13,15-17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution S72G;

4. Ansprüche: (3,6-13,15-17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

von Bacillus megaterium mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution A74G;

5. Ansprüche: (3,6-13,15-17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von Bacillus megaterium mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution F87V;

6. Ansprüche: (3,6-13,16,17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von Bacillus megaterium mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution L188z, worin z für eine Aminosäure, ausgewählt unter K,R,W,Q,N,G,A und S steht;

7. Ansprüche: (3,6-13,15-17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von Bacillus megaterium mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution M354T;

8. Ansprüche: (3-5,7-14,16,17)-partiell

Monooxygenase von Bacillus megaterium mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224; besagte Monooxygenase, gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresubstitutionsmutante F87V aufweist; Nukleinsäure kodierend für besagte Monooxygenase; Expressionskonstrukt, enthaltend besagte Nukleinsäure; Vektor, umfassend besagtes Expressionsprodukt; Rekombinierter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem besagten Vektor; besagter Mikroorganismus, ausgewählt unter Bakterien der Gattung Escherichia; Verfahren zur Herstellung von terminal oder subterminal hydroxylierten aliphatischen Carbonsäuren mittels besagter Monooxygenase, gekennzeichnet durch eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei eine Aminosäuresubstitutionsmutante F87V sein muss; besagtes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C8-C30-Monocarbonsäure oder ein Derivat davon einsetzt; besagtes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion in Gegenwart eines Elektronendonors oder Reduktionsäquivalent, ausgewählt unter NADH, NADPH und Zn/Co(III)sepulchrat, durchführt.

9. Ansprüche: (3-5,7-14,16,17)-partiell

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Idem wie Erfindung 8, aber beschränkt auf Monooxygenasen von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei die Monooxygenasen das Aminosäuresubstitutionsmuster F87A, L188K oder F87V, L188K aufweisen;

10. Ansprüche: (3-5,7-14,16,17)-partiell

Idem wie Erfindung 8, aber beschränkt auf Monooxygenasen von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei die Monooxygenasen das Aminosäuresubstitutionsmuster F87A, L188K, A74G oder F87V, L188K, A74G aufweisen;

11. Ansprüche: (3-5,7-17)-partiell

Idem wie Erfindung 8, aber beschränkt auf Monooxygenasen von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei die Monooxygenasen das Aminosäuresubstitutionsmuster F87A, L188K, A74G, R47F oder F87V, L188K, A74G, R47F aufweisen;

12. Ansprüche: (3-5,7-17)-partiell

Idem wie Erfindung 8, aber beschränkt auf Monooxygenasen von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei die Monooxygenasen das Aminosäuresubstitutionsmuster F87A, L188K, A74G, R47F, V26T oder F87V, L188K, A74G, R47F, V26T aufweisen;

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: les Aktenzeichen

PCT/EP 00/07252

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 2294692 A	08-05-1996	AU 705736 B	03-06-1999
		AU 3811795 A	31-05-1996
		CN 1171818 A	28-01-1998
		CZ 9701277 A	15-10-1997
		EP 0789770 A	20-08-1997
		WO 9614419 A	17-05-1996
		JP 10503658 T	07-04-1998
		KR 234348 B	15-12-1999
		NZ 294904 A	24-09-1998
		PL 319970 A	01-09-1997
		RU 2133774 C	27-07-1999
		SK 54597 A	04-02-1998
		US 6100074 A	08-08-2000

WO 0031273 A	02-06-2000	AU 1281900 A	13-06-2000
