

(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
21. Dezember 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/77220 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/52, 15/54, 15/62, 9/10, C12P 13/04, 21/02
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01950
- (22) Internationales Anmeldedatum:
15. Juni 2000 (15.06.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 28 313.3 16. Juni 1999 (16.06.1999) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: KELLER, Ullrich [DE/DE]; Selbitzerstr. 16 c,
D-14089 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHAUWECKER,
Florian [DE/DE]; Herderstr. 35, D-12163 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: NOBBE, Matthias; Viering, Jentschura & Part-
ner, Essener Strasse 5, D-46047 Oberhausen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,

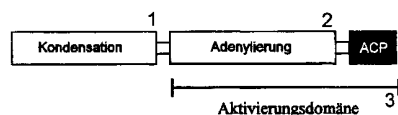
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD OF MODIFYING PEPTIDE SYNTHETASES SUCH THAT THEY CAN N-METHYLATE THEIR SUB-
STRATE AMINO ACIDS

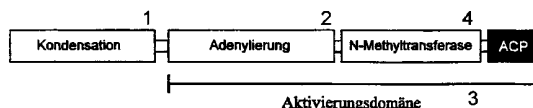
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VERÄNDERUNG VON PEPTIDSYNTHETASEN IN DER WEISE, DASS SIE IHRE
SUBSTRATAMINOSÄUREN N-METHYLIEREN KÖNNEN

Abbildung 1: Modul einer PPS und Unterteilung in funktionelle Domänen
MODULE OF A PPS AND SUBDIVISION INTO FUNCTIONAL DOMAINS

A: Minimal-Modul einer PPS



B: Modul mit N-Methyltransferase-Domäne



- A: MINIMAL MODULE OF A PPS
1...CONDENSATION
2...ADENYLATION
3...ACTIVATION DOMAIN
B: MODULE WITH N-METHYL TRANSFERASE DOMAIN
4...N-METHYL TRANSFERASE

(57) Abstract: The invention relates to a method of modifying peptide synthetases in such a manner that they can N-methylate their substrate amino acids. PPS are enzymes that synthesize peptides in a non-ribosomal manner. PPS have a modular set-up. Each module has an activation domain which recognizes and covalently binds to the respective substrate amino acid. The peptide synthesis catalyzed by PPS proceeds by the condensation of the covalently bound substrate amino acids. A minor number of the known activation domains is capable of also N-methylating the bound substrate amino acids. The inventive method allows conversion of the activation domains to activation domains with N-methyl transferase activity while maintaining the original substrate specificity.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Veröffentlicht:

— *Mit internationalem Recherchenbericht.*

- (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).

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

29. März 2001

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.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Veränderung von Peptidsynthetasen (PPS) in der Weise, daß sie ihre Substrataminosäuren N-methylieren können. PPS sind Enzyme, die Peptide auf nicht-ribosomale Weise synthetisieren. Die PPS sind modular aufgebaut. Jedes Modul besitzt eine Aktivierungsdomäne, welche die jeweilige Substrataminosäure erkennt und kovalent bindet. Die von der PPS katalysierte Peptidsynthese erfolgt dann durch die Kondensation der kovalent gebundenen Substrataminosäuren. Eine geringe Anzahl der bekannten Aktivierungsdomänen ist in der Lage, die gebundenen Substrataminosäuren auch zu N-methylieren. Die hier beschriebene Erfindung ermöglicht die Umwandlung von Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität in Aktivierungsolomänen nu7 N-ile-thyltransferase-Aktivität, wobei die ursprüngliche Substratspezifität erhalten bleibt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/01950

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/52 C12N15/54 C12N15/62 C12N9/10 C12P13/04
C12P21/02

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)

MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 789 078 A (ENIRICERCHE SPA) 13 August 1997 (1997-08-13) page 2, line 27,28 page 3, line 57-59 claims 1,3,4 ---	1-10
A	EP 0 637 630 A (ENIRICERCHE SPA) 8 February 1995 (1995-02-08) page 4, line 44 -page 5, line 3; figure 3 claim 1 ---	1-10
A	EP 0 578 616 A (SANDOZ LTD ;SANDOZ AG (DE)) 12 January 1994 (1994-01-12) page 1, line 13-16 page 4, line 15-17; example 7 claims 12,13 --- -/--	1-10



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

24 November 2000

Date of mailing of the international search report

13/12/2000

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

van de Kamp, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/01950

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 02659 A (STEMPFER GUENTHER ;BIOCHEMIE GMBH (AT); SCHOERGENDORFER KURT (AT);) 21 January 1999 (1999-01-21) page 6, line 7-10 claims 1-3,5,6,10 ---	1-10
A	SCHNEIDER A ET AL: "Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 257, no. 3, February 1998 (1998-02), pages 308-318, XP002141778 abstract ---	1-4
A	SCHAUWECKER F ET AL.: "Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from Streptomyces chrysomallus and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 180, no. 9, May 1998 (1998-05), pages 2468-2474, XP002153252 abstract; figure 1 ---	1-4
A	KELLER U: "Actinomycin synthetases. Multifunctional enzymes responsible for the synthesis of the peptide chains of actinomycin." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 262, no. 12, 25 April 1987 (1987-04-25), pages 5852-5856, XP002153253 abstract ---	1-4
A	BURMESTER J ET AL: "Highly conserved N- methyltransferases as an integral part of peptide synthetases." BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 37, no. 2, October 1995 (1995-10), pages 201-207, XP000965322 abstract ---	1-10
A	BILlich A ET AL.: "Formation of N-methylated peptide bonds in peptides and peptidols" BIOCHEM. PEPT. ANTIBIOT. (EDITOR(S): KLEINKAUF H; VON DOEHREN H.) PUBL: DE GRUYTER, BERLIN, FED. REP. GER. , 1990, pages 57-59, XP000965466 the whole document ---	1-10

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/01950

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARAHIEL M A ET AL: "Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis" CHEMICAL REVIEWS, vol. 97, no. 7, November 1997 (1997-11), pages 2651-2673, XP002133489 page 2668, paragraph V.B page 2669, paragraph VI -page 2671, paragraph VII -----	1-10
P,X	SCHAUWECKER F ET AL.: "Construction and in vitro analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides" CHEMISTRY AND BIOLOGY, vol. 7, no. 4, 20 March 2000 (2000-03-20), pages 287-297, XP000957461 the whole document -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01950

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0789078 A	13-08-1997	IT MI951764 A US 5795738 A	10-02-1997 18-08-1998
EP 0637630 A	08-02-1995	IT 1264712 B JP 7147978 A US 5652116 A	04-10-1996 13-06-1995 29-07-1997
EP 0578616 A	12-01-1994	AT 398434 B AT 398578 B AT 43793 A JP 6225773 A US 5827706 A AT 140392 A	27-12-1994 27-12-1994 15-04-1994 16-08-1994 27-10-1998 15-05-1994
WO 9902659 A	21-01-1999	AU 8631198 A EP 0994943 A	08-02-1999 26-04-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01950

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/52 C12N15/54 C12N15/62 C12N9/10 C12P13/04
C12P21/02

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)

MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 789 078 A (ENIRICERCH SPA) 13. August 1997 (1997-08-13) Seite 2, Zeile 27,28 Seite 3, Zeile 57-59 Ansprüche 1,3,4 ---	1-10
A	EP 0 637 630 A (ENIRICERCH SPA) 8. Februar 1995 (1995-02-08) Seite 4, Zeile 44 -Seite 5, Zeile 3; Abbildung 3 Anspruch 1 ---	1-10
A	EP 0 578 616 A (SANDOZ LTD ;SANDOZ AG (DE)) 12. Januar 1994 (1994-01-12) Seite 1, Zeile 13-16 Seite 4, Zeile 15-17; Beispiel 7 Ansprüche 12,13 --- -/--	1-10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ 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

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/12/2000

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 de Kamp, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 02659 A (STEMPFER GUENTHER ;BIOCHEMIE GMBH (AT); SCHOERGENDORFER KURT (AT);) 21. Januar 1999 (1999-01-21) Seite 6, Zeile 7-10 Ansprüche 1-3,5,6,10 ----	1-10
A	SCHNEIDER A ET AL: "Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, Bd. 257, Nr. 3, Februar 1998 (1998-02), Seiten 308-318, XP002141778 Zusammenfassung ----	1-4
A	SCHAUWECKER F ET AL.: "Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from Streptomyces chrysomallus and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 180, Nr. 9, Mai 1998 (1998-05), Seiten 2468-2474, XP002153252 Zusammenfassung; Abbildung 1 ----	1-4
A	KELLER U: "Actinomycin synthetases. Multifunctional enzymes responsible for the synthesis of the peptide chains of actinomycin." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 262, Nr. 12, 25. April 1987 (1987-04-25), Seiten 5852-5856, XP002153253 Zusammenfassung ----	1-4
A	BURMESTER J ET AL: "Highly conserved N- methyltransferases as an integral part of peptide synthetases." BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, Bd. 37, Nr. 2, Oktober 1995 (1995-10), Seiten 201-207, XP000965322 Zusammenfassung ----	1-10
A	BILLICH A ET AL.: "Formation of N-methylated peptide bonds in peptides and peptidols" BIOCHEM. PEPT. ANTIBIOT. (EDITOR(S): KLEINKAUF H; VON DOEHREN H.) PUBL: DE GRUYTER, BERLIN, FED. REP. GER. , 1990, Seiten 57-59, XP000965466 das ganze Dokument ----- -/--	1-10

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MARAHIEL M A ET AL: "Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis" CHEMICAL REVIEWS, Bd. 97, Nr. 7, November 1997 (1997-11), Seiten 2651-2673, XP002133489 Seite 2668, Absatz V.B Seite 2669, Absatz VI -Seite 2671, Absatz VII -----	1-10
P,X	SCHAUWECKER F ET AL.: "Construction and in vitro analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides" CHEMISTRY AND BIOLOGY, Bd. 7, Nr. 4, 20. März 2000 (2000-03-20), Seiten 287-297, XP000957461 das ganze Dokument -----	1-10

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01950

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0789078 A	13-08-1997	IT MI951764 A	10-02-1997
		US 5795738 A	18-08-1998
EP 0637630 A	08-02-1995	IT 1264712 B	04-10-1996
		JP 7147978 A	13-06-1995
		US 5652116 A	29-07-1997
EP 0578616 A	12-01-1994	AT 398434 B	27-12-1994
		AT 398578 B	27-12-1994
		AT 43793 A	15-04-1994
		JP 6225773 A	16-08-1994
		US 5827706 A	27-10-1998
		AT 140392 A	15-05-1994
WO 9902659 A	21-01-1999	AU 8631198 A	08-02-1999
		EP 0994943 A	26-04-2000