(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
15. Dezember 2005 (15.12.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/118793 A3

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 9/54 (2006.01) *C11D 3/386* (2006.01)
D06M 15/15 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/005746

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. Mai 2005 (28.05.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 027 091.0 2. Juni 2004 (02.06.2004) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN** [DE/DE]; Henkelstr. 67, 40589 Düsseldorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **WIELAND, Susanne** [DE/DE]; Schlossstrasse 25, 41541 Dormagen-Zons (DE). **WEBER, Angrit** [DE/DE]; Heckenweg 48a, 53757 Sankt Augustin (DE). **BECKERS, Angela** [DE/DE]; Feldgärtenstr. 38, 50735 Köln (DE). **MAURER, Karl-Heinz** [DE/DE]; Dechenstr. 5, 40699 Erkrath (DE). **KOTTWITZ, Beatrix** [DE/DE]; Am Kleff 49, 40699 Erkrath (DE). **FOURAGE, Laurent** [FR/FR]; 195 rue du 19 Mars 1962, F-30870 Clarensac (FR). **LEFEVRE, Fabrice** [FR/FR]; 567 chemin de la Préfecture, F-30900 Nimes (FR).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **HENKEL KGAA**; VTP Patente, 40191 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 23. März 2006

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:** ALKALINE PROTEASE VARIANTS HAVING IMPROVED PERFORMANCE AND WASHING AND CLEANING AGENTS CONTAINING SAID ALKALINE PROTEASE VARIANTS HAVING IMPROVED PERFORMANCE

(54) **Bezeichnung:** LEISTUNGSVERBESSERTE ALKALISCHE PROTEASE-VARIANTEN UND WASCH- UND REINIGUNGSMITTEL, ENTHALTEND DIESE LEISTUNGSVERBESSERTEN ALKALISCHE PROTEASE-VARIANTEN

(57) **Abstract:** The invention relates to variants of alkaline proteases of the subtilisin type having amino acid exchanges 224V, 250G and 253N and/or 34V according to the numbering of alkaline protease from *Bacillus lentus*. These variants can be combined with other mutations and point mutations, especially with exchanges in positions 3, 4, and/or 211. Exchanges L211D, L211N, L211Q and L211E have been found to be especially advantageous among the exchanges in position 211. The invention also relates to washing and cleaning agents comprising said protease variants, to corresponding washing and cleaning methods and to their use in washing and cleaning agents. The invention also relates to further technical applications.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Anmeldung betrifft Varianten Alkalischer Proteasen vom Subtilisin-Typ mit den Aminosäureaustauschen 224V, 250G und 253N und/oder 43V in der Zählung der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus*. Sie sind mit weiteren Mutationen und Punktmutationen kombinierbar, insbesondere mit Austauschen in den Positionen 3, 4, und/oder 211. Unter denen in Position 211 haben sich die Austausche L211 D, L21 1 N, L211 Q und L211 E als besonders vorteilhaft herausgestellt. Diese Anmeldung betrifft außerdem Wasch- und Reinigungsmittel mit solchen Protease-Varianten, entsprechende Wasch- und Reinigungsverfahren und deren Verwendung in Wasch- und Reinigungsmitteln. Zudem nennt sie weitere technische Einsatzmöglichkeiten.

WO 2005/118793 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/005746

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N9/54 D06M15/15 C11D3/386

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)
C12N

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, Sequence Search, 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.
X	WO 03/056017 A (HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN; WEBER, ANGRIT; HELLEBRANDT, A) 10 July 2003 (2003-07-10) cited in the application	1-7, 15-52
Y	page 81 - page 82	8
Y	US 5 340 735 A (CHRISTIANSON ET AL) 23 August 1994 (1994-08-23) cited in the application column 7 - column 11; tables 2,3	8
A	US 5 855 625 A (MAURER ET AL) 5 January 1999 (1999-01-05) cited in the application column 3 - column 4	

-/--

[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
15 August 2005	

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	Schneider, P 03 JAN 2006

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/005746

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 95/23221 A (COGNIS, INC) 31 August 1995 (1995-08-31) cited in the application the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/005746

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.:

1-7, 15-52 (all in part), 8 (in full)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/EP2005/005746

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims: 1-7, 15-52 (all in part), 8 (in full)

   A variant of the alkaline protease of the subtilisin type from *Bacillus lentus* DSM5483 with the mutations S3T/V4I/A224V/S250G/S253N, represented in SEQ ID No. 12, the coding nucleic acid SEQ ID No. 11, corresponding vectors and host cells, methods for producing the protease and for mechanically cleaning textiles or hard surfaces using the protease or agents containing said protease.

   ---

2. Claims: 4-7, 14-52 (all in part), 9, 11-13 (all in full)

   As per invention 1, but with additional mutations at position 211 (L211D, L211N, L211Q and L211E), represented by SEQ ID Nos. 15, 16, 25, 26, 29, 30, 33 and 34.

   ---

3. Claims: 1-7, 14-52 (all in part), 10 (in full)

   As per invention 1, but additionally with the mutation I43V and the combination I43V + L211D, represented by SEQ ID Nos. 21, 22, 35, 36.

   ---

4. Claims: 8, 22 (all in part)

   As per invention 1, but additionally with the variation of the signal sequence, represented by SEQ ID Nos. 37 and 38.

   ---

5. Claim: 22 (in part)

   A nucleic acid coding for the alkaline protease from *Bacillus lentus*, represented by SEQ ID No. 1, which represents the wild type without any mutation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2005/005746

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03056017 A	10-07-2003	AU 2002361062 A1	15-07-2003
		CN 1606626 A	13-04-2005
		DE 10163883 A1	10-07-2003
		EP 1456384 A2	15-09-2004
		HU 0402429 A2	28-02-2005
		JP 2005525794 T	02-09-2005
		US 2005009167 A1	13-01-2005
US 5340735 A	23-08-1994	AT 203771 T	15-08-2001
		DE 69231974 D1	06-09-2001
		DE 69231974 T2	04-04-2002
		DK 590012 T3	12-11-2001
		EP 0590012 A1	06-04-1994
		ES 2164644 T3	01-03-2002
		GR 3037002 T3	31-01-2002
		JP 6508264 T	22-09-1994
		JP 3444422 B2	08-09-2003
		WO 9221760 A1	10-12-1992
		US 5500364 A	19-03-1996
US 5855625 A	05-01-1999	US 5691295 A	25-11-1997
WO 9523221 A	31-08-1995	EP 0701605 A1	20-03-1996
		JP 10507901 T	04-08-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/005746

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
C12N9/54 D06M15/15 C11D3/386

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12N

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, Sequence Search, 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.
X	WO 03/056017 A (HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN; WEBER, ANGRIT; HELLEBRANDT, A) 10. Juli 2003 (2003-07-10) in der Anmeldung erwähnt	1-7, 15-52
Y	Seite 81 - Seite 82	8
Y	US 5 340 735 A (CHRISTIANSON ET AL) 23. August 1994 (1994-08-23) in der Anmeldung erwähnt Spalte 7 - Spalte 11; Tabellen 2,3	8
A	US 5 855 625 A (MAURER ET AL) 5. Januar 1999 (1999-01-05) in der Anmeldung erwähnt Spalte 3 - Spalte 4	

-/--

[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
15. August 2005	03. 01. 2006

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
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	Schneider, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/005746

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95/23221 A (COGNIS, INC) 31. August 1995 (1995-08-31) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/005746

Feld II 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 III 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 Recherchengebühren 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 Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren 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 Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-7, 15-52 (alle teilweise), 8 (komplett)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren 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: 1-7,15-52 (alle teilweise),8 (komplett)

   Eine Variante der alkalischen Protease vom Subtilisin-Typ aus Bacillus lentus DSM5483 mit den Mutationen S3T/V4I/A224V/S250G/S253N, dargestellt in SEQ ID NO. 12, die kodierende Nukleinsäure SEQ ID NO.11, entsprechende Vektoren und Wirtszellen, Verfahren zur Hertsellung der Protease und zur maschinellen Reinigung von Textilien bzw. harten Oberflächen unter Benutzung der Protease sowiei Mittel, die diese Protease enthalten.

   ---

2. Ansprüche: 4-7,14-52 (alle teilweise),9,11-13 (alle komplett)

   Wie Erfindung 1, aber mit zusätzlichen Mutationen an Position 211 (L211D, L211N, L211Q und L211E), repräsentiert durch die SEQ ID NOs. 15,16,25,26,29,30,33 und 34.

   ---

3. Ansprüche: 1-7,14-52 (alle teilweise),10 (komplett)

   Wie Erfindung 1, aber zusätzlich mit der Mutation I43V sowie die Kombination I43V + L211D, repräsentiert durch SEQ ID NOs.21,22,35,36

   ---

4. Ansprüche: 8,22 (alle teilweise)

   Wie Erfindung 1, aber zusätzlich mit der Variation der Signalsequenz, repräsentiert durch SEQ ID NOs.37 und 38

   ---

5. Anspruch: 22 (teilweise)

   Eine Nukleinsäure, die für die akalische Protease aus Bacillus lentus kodiert, repräsentiert durch SEQ ID NO.1, welche den Wildtyp ohne jegliche Mutation repräsentiert

   ---

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/005746

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03056017 A	10-07-2003	AU 2002361062 A1	15-07-2003
		CN 1606626 A	13-04-2005
		DE 10163883 A1	10-07-2003
		EP 1456384 A2	15-09-2004
		HU 0402429 A2	28-02-2005
		JP 2005525794 T	02-09-2005
		US 2005009167 A1	13-01-2005
US 5340735 A	23-08-1994	AT 203771 T	15-08-2001
		DE 69231974 D1	06-09-2001
		DE 69231974 T2	04-04-2002
		DK 590012 T3	12-11-2001
		EP 0590012 A1	06-04-1994
		ES 2164644 T3	01-03-2002
		GR 3037002 T3	31-01-2002
		JP 6508264 T	22-09-1994
		JP 3444422 B2	08-09-2003
		WO 9221760 A1	10-12-1992
		US 5500364 A	19-03-1996
US 5855625 A	05-01-1999	US 5691295 A	25-11-1997
WO 9523221 A	31-08-1995	EP 0701605 A1	20-03-1996
		JP 10507901 T	04-08-1998