

(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
6. Dezember 2012 (06.12.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/163855 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 15/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/059901

(22) Internationales Anmeldedatum:
25. Mai 2012 (25.05.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2011 118 032.3 31. Mai 2011 (31.05.2011) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **HENKEL AG & CO. KGAA** [DE/DE];
Henkelstr. 67, 40589 Düsseldorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **DEGERING, Christian**
[DE/DE]; Hauptstrasse 53, 40699 Erkrath (DE).
EGGERT, Thorsten [DE/DE]; Im Poth 45, 45529
Hattingen (DE). **EVERS, Stefan** [DE/DE]; Wiedenhofer
Str. 26, 42781 Haan (DE). **MAURER, Karl-Heinz**
[DE/DE]; Dechenstrasse 5, 40699 Erkrath (DE).
BONGAERTS, Johannes [DE/DE]; Arenzheide 5, 41541
Dormagen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

(54) Title: EXPRESSION VECTORS FOR AN IMPROVED PROTEIN SECRETION

(54) Bezeichnung : EXPRESSIONSVEKTOREN ZUR VERBESSERTEN PROTEINSEKRETION

(57) Abstract: The aim of the invention is to improve the secretion of a protein from a host cell in order to increase the product yield of protein in a fermentation process. This is achieved by an expression vector comprising a) a promoter sequence and b) a nucleic acid sequence that codes for a protein. The protein comprises a signal peptide and an additional amino acid sequence, and the signal peptide comprises an amino acid sequence that is at least 80% identical to the amino acid sequence specified in SEQ ID NO. 2, at least 80% identical to the amino acid sequence specified in SEQ ID NO. 4, at least 80% identical to the amino acid sequence specified in SEQ ID NO. 6, or the signal peptide comprises an amino acid sequence that is structurally homologous to at least one of said sequences.

(57) Zusammenfassung: Die Sekretion eines Proteins aus einer Wirtszelle soll verbessert werden, um die Produktausbeute an Protein in einer Fermentation zu steigern. Dies gelingt durch einen Expressionsvektor umfassend a) eine Promotorsequenz und b) eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein codiert, wobei das Protein ein Signalpeptid und eine weitere Aminosäuresequenz umfasst und das Signalpeptid eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist oder zu der in SEQ ID NO. 4 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist oder zu der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist, oder das Signalpeptid eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu mindestens einer dieser Sequenzen strukturhomolog ist.



WO 2012/163855 A1

Expressionsvektoren zur verbesserten Proteinsekretion

Die Erfindung liegt auf dem Gebiet der Biotechnologie, insbesondere der mikrobiellen Proteinsynthese. Die Erfindung betrifft insbesondere Expressionsvektoren zur Herstellung von Proteinen und schlägt ferner Wirtszellen vor, die derartige Expressionsvektoren enthalten. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren und Verwendungen derartiger Expressionsvektoren und Wirtszellen zur Proteinherstellung.

Für die Herstellung von Proteinen können Wirtszellen, insbesondere Mikroorganismen, eingesetzt werden, die die Gene der interessierenden Proteine exprimieren. Das Gen eines Proteins von Interesse (Transgen) wird in der Regel in die Wirtszellen derart eingebracht, dass es von diesen exprimiert wird. Häufig liegt es auf einem so genannten Expressionsvektor zusammen mit einer oder mehreren Promotorsequenzen (Promotoren) vor, wodurch die Genexpression ermöglicht wird.

Für die großtechnische, biotechnologische Produktion werden die betreffenden Wirtszellen in Fermentern kultiviert, die den Stoffwechseleigenschaften der Zellen entsprechend ausgestaltet sind. Während der Kultivierung verstoffwechseln die Wirtszellen das angebotene Substrat und bilden das gewünschte Produkt, das nach Beendigung der Fermentation üblicherweise von den Produktionsorganismen abgetrennt wird und aus dem Fermenterbrei und/oder dem Fermentationsmedium aufgereinigt und/oder aufkonzentriert wird.

Es ist grundsätzlich wünschenswert, eine möglichst hohe Produktausbeute in der Fermentation zu erhalten. Die Produktausbeute ist dabei abhängig von mehreren Faktoren, beispielsweise bilden die Wirtszellen neben dem eigentlich gewünschten Produkt üblicherweise eine Vielzahl weiterer Substanzen, an denen in der Regel kein Interesse besteht. Weiter hängt die Expression eines Transgens und damit die Produktausbeute wesentlich von dem verwendeten Expressionssystem ab. Beispielsweise offenbart die internationale Patentanmeldung WO 91/02792 die verbesserte fermentative Produktion einer alkalischen Protease aus *Bacillus lentus* in einem optimierten *Bacillus licheniformis*-Stamm unter der Kontrolle genregulatorischer Sequenzen aus *Bacillus licheniformis*, insbesondere des *Bacillus licheniformis*-Promotors.

Vorzugsweise werden für die industrielle Produktion von Proteinen, beispielsweise hydrolytischen Enzymen, solche Wirtszellen eingesetzt, die in der Lage sind große Mengen des Proteins in den Kulturüberstand zu sezernieren, was einen aufwändigen Zellaufschluss, der bei der intrazellulären Produktion notwendig ist, überflüssig macht. Hierfür werden vorzugsweise solche Wirtszellen,

beispielsweise Bacillus-Spezies, eingesetzt, die sich mit kostengünstigen Nährmedien in effizienten Hochzelldichte-Fermentationen kultivieren lassen und in der Lage sind, mehrere Gramm pro Liter des Zielproteins in den Kulturüberstand zu sezernieren. Üblicherweise wird das zu sezernierende Protein von Expressionsvektoren exprimiert, die in die Wirtszelle eingebracht worden sind und für das zu sezernierende Protein codieren. Das exprimierte Protein umfasst üblicherweise ein Signalpeptid (Signalsequenz), die dessen Export aus der Wirtszelle bewirkt. Das Signalpeptid ist üblicherweise Teil der in der Wirtszelle translatierten Polypeptidkette, es kann von dem Protein aber posttranslational noch innerhalb oder außerhalb der Wirtszelle abgespalten werden.

Gerade für diese extrazelluläre Produktion von heterologen Proteinen gibt es allerdings zahlreiche Engpässe und einen dementsprechend hohen Bedarf, die Abläufe der Sekretion zu optimieren. Einer dieser Engpässe ist die Auswahl eines Signalpeptids, das einen effizienten Export des Zielproteins aus der Wirtszelle erlaubt. Signalpeptide können grundsätzlich neu kombiniert werden mit Proteinen, insbesondere Enzymen. Beispielsweise wird in der Veröffentlichung von Brockmeier et al. (J. Mol. Biol. 362, S. 393-402 (2006)) die Strategie des Screenings einer Signalpeptid-Bibliothek am Beispiel einer Cutinase beschrieben. Jedoch bewirkt nicht jedes Signalpeptid auch einen ausreichenden Export des Proteins unter Fermentationsbedingungen, insbesondere industriellen bzw. großtechnischen Fermentationsbedingungen.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, die Sekretion eines Proteins aus einer Wirtszelle zu verbessern und dadurch die Produktausbeute an Protein in einer Fermentation zu steigern.

Gegenstand der Erfindung ist ein Expressionsvektor umfassend

- a) eine Promotorsequenz und
- b) eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein codiert, wobei das Protein ein Signalpeptid und eine weitere Aminosäuresequenz umfasst und das Signalpeptid eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist oder zu der in SEQ ID NO. 4 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist oder zu der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist, oder das Signalpeptid eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu mindestens einer dieser Sequenzen strukturhomolog ist.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass durch einen Expressionsvektor, der für ein Protein mit einem derartigen Signalpeptid codiert, eine verbesserte Sekretion des Proteins aus einer Wirtszelle erreicht wird, die den Expressionsvektor beinhaltet und die Nukleinsäuresequenz b) exprimiert. Hierdurch ist es in bevorzugten Ausgestaltungen der Erfindung möglich, die Produktausbeute an Protein in einer Fermentation zu steigern.

Ein Expressionsvektor ist eine Nukleinsäuresequenz, die bewirkt, dass das Protein in einer Wirtszelle, insbesondere einem Mikroorganismus, exprimiert werden kann. Er umfasst die genetische Information, also diejenige Nukleinsäuresequenz (Gen) b), die für das Protein codiert.

Die Expression einer Nukleinsäuresequenz ist dessen Übersetzung in das bzw. die von dieser Sequenz codierte(n) Genprodukt(e), also in ein Polypeptid (Protein) bzw. in mehrere Polypeptide (Proteine). Die Begriffe Polypeptid und Protein werden in der vorliegenden Anmeldung synonym verwendet. Im Sinne der vorliegenden Erfindung bezeichnet Expression folglich die Biosynthese von Ribonucleinsäure (RNA) und Proteinen aus den genetischen Informationen. In der Regel umfasst die Expression die Transkription, also die Synthese einer Boten („messenger“-Ribonucleinsäure (mRNA) anhand der DNA (Desoxyribonucleinsäure)-Sequenz des Gens und deren Translation in die entsprechende Polypeptidkette, die gegebenenfalls noch post-translational modifiziert werden kann. Das Exprimieren eines Proteins beschreibt folglich die Biosynthese desselben aus den genetischen Informationen, die erfindungsgemäß auf dem Expressionsvektor bereitgestellt werden.

Vektoren sind aus Nukleinsäuren, vorzugsweise Desoxyribonucleinsäure (DNA) bestehende genetische Elemente und sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Biotechnologie bekannt. Sie sind insbesondere bei der Verwendung in Bakterien spezielle Plasmide, also zirkulare genetische Elemente. Zu den Vektoren können beispielsweise solche gehören, die sich von bakteriellen Plasmiden, von Viren oder von Bacteriophagen ableiten, oder überwiegend synthetische Vektoren oder Plasmide mit Elementen verschiedenster Herkunft. Mit den weiteren jeweils vorhandenen genetischen Elementen vermögen Vektoren sich in Wirtszellen, in die sie vorzugsweise durch Transformation eingebracht wurden, über mehrere Generationen hinweg als stabile Einheiten zu etablieren. Es ist dabei im Sinne der Erfindung unerheblich, ob sie sich extrachromosomal als eigene Einheiten etablieren oder in ein Chromosom bzw. chromosomale DNA integrieren. Welches der zahlreichen Systeme gewählt wird, hängt vom Einzelfall ab. Ausschlaggebend können beispielsweise die erreichbare Kopienzahl, die zur Verfügung stehenden Selektionssysteme, darunter vor allem die Antibiotikaresistenzen, oder die Kultivierbarkeit der zur Aufnahme der Vektoren befähigten Wirtszellen sein.

Expressionsvektoren können ferner durch Änderungen der Kulturbedingungen wie beispielsweise die Zelldichte oder die Zugabe von bestimmten Verbindungen regulierbar sein. Ein Beispiel für eine solche Verbindung ist das Galactose-Derivat Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches als Aktivator des bakteriellen Lactose-Operons (lac-Operons) verwendet wird.

Ein Expressionsvektor umfasst ferner mindestens eine Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise DNA, mit einer Steuerungsfunktion für die Expression der für das Protein codierenden

Nukleinsäuresequenz b) (eine sog. genregulatorische Sequenz). Eine genregulatorische Sequenz ist hierbei jede Nukleinsäuresequenz, deren Anwesenheit in der jeweiligen Wirtszelle die Transkriptionshäufigkeit der Nukleinsäuresequenz b) beeinflusst, vorzugsweise erhöht, die für das Protein codiert. Vorzugsweise handelt es sich um eine Promotor-Sequenz, da eine derartige Sequenz für die Expression der Nukleinsäuresequenz b) wesentlich ist. Ein erfindungsgemäßer Expressionsvektor kann aber auch noch weitere genregulatorische Sequenzen umfassen, beispielsweise eine oder mehrere Enhancer-Sequenzen. Ein Expressionsvektor im Rahmen der Erfindung umfasst folglich mindestens eine funktionelle Einheit aus der Nukleinsäuresequenz b) und einem Promotor (Expressionskassette). Sie kann, muss jedoch nicht notwendigerweise, als physische Einheit vorliegen. Der Promotor bewirkt die Expression der Nukleinsäuresequenz b) in der Wirtszelle. Ein Expressionsvektor kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch auf die reine Expressionskassette aus Promotor und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz b) beschränkt sein, wobei diese Expressionskassette extrachromosomal oder auch chromosomal integriert vorliegen kann. Derartige Ausgestaltungen erfindungsgemäßer Expressionsvektoren stellen jeweils eine gesonderte Ausführungsform der Erfindung dar.

Das Vorhandensein von mindestens einem Promotor ist für einen erfindungsgemäßen Expressionsvektor folglich wesentlich. Unter einem Promotor wird demnach eine DNA-Sequenz verstanden, die die regulierte Expression eines Gens ermöglicht. Natürlicherweise ist eine Promotorsequenz ein Bestandteil eines Gens und liegt oftmals an dessen 5'-Ende und somit vor dem RNA-kodierenden Bereich. Vorzugsweise liegt die Promotorsequenz in einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor 5'-wärts von der für das Protein codierenden Nukleinsäuresequenz b). Die wichtigste Eigenschaft eines Promotors ist die spezifische Wechselwirkung mit mindestens einem DNA-bindenden Protein bzw. Polypeptid, welches den Start der Transkription des Gens durch eine RNA-Polymerase vermittelt und als Transkriptionsfaktor bezeichnet wird. Häufig sind mehrere Transkriptionsfaktoren und/oder weitere Proteine am Start der Transkription durch eine RNA-Polymerase beteiligt. Ein Promotor ist demnach vorzugsweise eine DNA-Sequenz mit Promotoraktivität, d.h. eine DNA-Sequenz, an die mindestens ein Transkriptionsfaktor zur Initiation der Transkription eines Gens zumindest transient bindet. Die Stärke eines Promotors ist messbar über die Transkriptionshäufigkeit des exprimierten Gens, also über die Anzahl der pro Zeiteinheit erzeugten RNA-Moleküle, insbesondere mRNA-Moleküle.

Bevorzugt liegen die Promotorsequenz (a) und die Nukleinsäuresequenz (b) hintereinander auf dem Expressionsvektor vor. Weiter bevorzugt befindet sich die Promotorsequenz (a) vor der Nukleinsäuresequenz (b) auf dem Nukleinsäuremolekül (in 5' → 3'-Orientierung). Ebenfalls bevorzugt befinden sich zwischen den beiden Nukleinsäuresequenzen (a) und (b) keine Nukleinsäuresequenzen, die die Transkriptionshäufigkeit der für das Protein codierenden Nukleinsäuresequenz (b) vermindern. Alle vorstehenden Angaben beziehen sich auf denjenigen

DNA-Strang, der die für das Protein codierende Nukleinsäuresequenz (b) beinhaltet (den codierenden Strang) und nicht auf den zugehörigen codogenen DNA-Strang. Ausgehend von der für das Protein codierenden Nukleinsäuresequenz (b) befindet sich die Promotorsequenz (a) folglich vorzugsweise weiter stromaufwärts, d.h. in 5'-Richtung, auf diesem DNA-Strang.

Die Nukleinsäuresequenz b) codiert für das zu sezernierende Protein. Hierbei handelt es sich um dasjenige Protein, das mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Expressionsvektors hergestellt werden soll (Zielprotein).

Das von der Nukleinsäuresequenz b) codierte Protein umfasst ein Signalpeptid mit einer Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist oder zu der in SEQ ID NO. 4 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist oder zu der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist. Es wurde festgestellt, dass derartige Signalpeptide eine effiziente Sekretion des sie enthaltenden Proteins, insbesondere rekombinanten Proteins, bewirken. Zunehmend bevorzugt umfasst das Signalpeptid eine Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, oder die zu der in SEQ ID NO. 4 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, oder die zu der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist. Besonders bevorzugt weist das Signalpeptid eine Aminosäuresequenz auf, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, oder die zu der in SEQ ID NO. 4 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist, oder die zu der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist.

Ganz besonders bevorzugt sind jeweils die zu 100% identischen Sequenzen, so dass ein entsprechend bevorzugter Expressionsvektor dadurch gekennzeichnet ist, dass das von der Nukleinsäuresequenz b) codierte Signalpeptid eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4 oder SEQ ID NO. 6 aufweist. Für derartige Signalpeptide codierende, besonders

bevorzugte Nukleinsäuresequenzen sind in SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 3 und SEQ ID NO. 5 angegeben.

Ferner ist es möglich, anstelle der genannten Signalpeptide, die eine Sekretion des Proteins ermöglichen, zu diesen Sequenzen strukturhomologe Sequenzen zu verwenden. Unter einer strukturhomologen Sequenz wird eine Aminosäuresequenz verstanden, deren Aminosäureabfolge eine vergleichbare räumliche Faltung aufweist wie ein Signalpeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4 oder SEQ ID NO. 6. Diese räumliche Faltung bewirkt, dass sie von der Wirtszelle als sekretorische Signalsequenz erkannt wird und folglich das die strukturhomologe Signalsequenz enthaltende Protein aus der Wirtszelle ausgeschleust wird. Vorzugsweise erfolgt eine Wechselwirkung mit dem von der Wirtszelle verwendeten Translokationssystem. Die strukturhomologe Aminosäuresequenz bindet daher vorzugsweise unmittelbar oder mittelbar an mindestens eine Komponente des Translokationssystems der Wirtszelle. Unter unmittelbarer Bindung wird eine direkte Interaktion verstanden, unter mittelbarer Bindung wird verstanden, dass die Interaktion über eine oder mehrere weitere Komponenten, insbesondere Proteine oder andere Moleküle, erfolgen kann, die als Adapter fungieren und dementsprechend eine Brückenfunktion haben zwischen der strukturhomologen Aminosäuresequenz und einer Komponente des Translokationssystems der Wirtszelle.

Die Bestimmung der Identität von Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen erfolgt durch einen Sequenzvergleich. Solch ein Vergleich erfolgt dadurch, dass ähnliche Abfolgen in den Nukleotidsequenzen oder Aminosäuresequenzen einander zugeordnet werden. Dieser Sequenzvergleich erfolgt vorzugsweise basierend auf dem im Stand der Technik etablierten und üblicherweise genutzten BLAST-Algorithmus (vgl. beispielsweise Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410, und Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, S.3389-3402) und geschieht prinzipiell dadurch, dass ähnliche Abfolgen von Nukleotiden oder Aminosäuren in den Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenzen einander zugeordnet werden. Eine tabellarische Zuordnung der betreffenden Positionen wird als Alignment bezeichnet. Ein weiterer im Stand der Technik verfügbarer Algorithmus ist der FASTA-Algorithmus. Sequenzvergleiche (Alignments), insbesondere multiple Sequenzvergleiche, werden üblicherweise mit Computerprogrammen erstellt. Häufig genutzt werden beispielsweise die Clustal-Serie (vgl. beispielsweise Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500), T-Coffee (vgl. beispielsweise Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) oder Programme, die auf diesen Programmen bzw. Algorithmen basieren. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden

Sequenzvergleiche und Alignments bevorzugt mit dem Computer-Programm Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, Kalifornien, USA) mit den vorgegebenen Standard (Default)-Parametern erstellt.

Solch ein Vergleich erlaubt eine Aussage über die Ähnlichkeit der verglichenen Sequenzen zueinander. Sie wird üblicherweise in Prozent Identität, das heißt dem Anteil der identischen Nukleotide oder Aminosäurereste an denselben bzw. in einem Alignment einander entsprechenden Positionen, angegeben. Der weiter gefasste Begriff der Homologie bezieht bei Aminosäuresequenzen konservierte Aminosäure-Austausche in die Betrachtung mit ein, also Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften, da diese innerhalb des Proteins meist ähnliche Aktivitäten bzw. Funktionen ausüben. Daher kann die Ähnlichkeit der verglichenen Sequenzen auch Prozent Homologie oder Prozent Ähnlichkeit angegeben sein. Identitäts- und/oder Homologieangaben können über ganze Polypeptide oder Gene oder nur über einzelne Bereiche getroffen werden. Homologe bzw. identische Bereiche von verschiedenen Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen sind daher durch Übereinstimmungen in den Sequenzen definiert. Sie weisen oftmals gleiche oder ähnliche Funktionen auf. Sie können klein sein und nur wenige Nukleotide bzw. Aminosäuren umfassen. Oftmals üben solche kleinen Bereiche für die Gesamtaktivität des Proteins essentielle Funktionen aus. Es kann daher sinnvoll sein, Sequenzübereinstimmungen nur auf einzelne, gegebenenfalls kleine Bereiche zu beziehen. Soweit nicht anders angegeben beziehen sich Identitäts- bzw. Homologieangaben in der vorliegenden Anmeldung aber auf die Gesamtlänge der jeweils angegebenen Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz.

Das von der Nukleinsäuresequenz b) codierte Protein umfasst ferner eine weitere Aminosäuresequenz. Bei dieser Aminosäuresequenz handelt es sich folglich um die eigentliche Aminosäuresequenz des Proteins ohne Signalpeptid. Vorzugsweise handelt es sich um die Aminosäuresequenz eines reifen Proteins. Unter einem reifen Protein wird dessen fertig prozessierte Form verstanden, da es möglich ist, dass von einem zugehörigen Gen eine immature Form codiert wird, die nach der Translation noch zur reifen Form prozessiert wird. Beispielsweise können immature Formen des Proteins Signal- und/oder Propeptide oder Elongationen am N-Terminus und/oder C-Terminus umfassen, die in der reifen Form nicht mehr vorhanden sind. Beispielsweise umfassen immature Formen von Proteasen, insbesondere Subtilasen und hierunter vor allem Subtilisine, ein Signalpeptid sowie ein Propeptid, die in der reifen (maturen) Form der Protease nicht mehr vorhanden sind. Alternativ handelt es sich bei der weiteren Aminosäuresequenz um die Aminosäuresequenz eines unreifen Proteins, welche ein Propeptid umfasst. Eine derartige Ausgestaltung kommt insbesondere auch für Proteasen, insbesondere Subtilasen und hierunter vor allem Subtilisine in Betracht. In besonders bevorzugten Ausgestaltungen umfasst die weitere Aminosäuresequenz kein weiteres Signalpeptid. Bei

derartigen erfindungsgemäßen Ausgestaltungen bewirkt folglich nur das erfindungsgemäße Signalpeptid die Sekretion des Proteins aus einer Wirtszelle.

Besonders bevorzugt umfasst die weitere Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäuresequenz eines Enzyms, insbesondere einer Protease, Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Mannanase, Tannase, Xylanase, Xanthanase, Xyloglucanase, β -Glucosidase, einem Pektin-spaltenden Enzym, Carrageenase, Perhydrolase, Oxidase, Oxidoreduktase oder einer Lipase, insbesondere ein Enzym wie nachstehend angegeben. Ganz besonders bevorzugt umfasst die weitere Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäuresequenz einer Protease und hierunter eines Subtilisins.

Beispielsweise kann eines der nachstehend genannten Enzyme mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor vorteilhaft hergestellt werden.

Unter den Proteasen sind Subtilisine bevorzugt. Beispiele hierfür sind die Subtilisine BPN' und Carlsberg, die Protease PB92, die Subtilisine 147 und 309, die Alkalische Protease aus *Bacillus lentus*, Subtilisin DY und die den Subtilasen, nicht mehr jedoch den Subtilisinen im engeren Sinne zuzuordnenden Enzyme Thermitase, Proteinase K und die Proteasen TW3 und TW7. Subtilisin Carlsberg ist in weiterentwickelter Form unter dem Handelsnamen Alcalase® von der Firma Novozymes A/S, Bagsværd, Dänemark, erhältlich. Die Subtilisine 147 und 309 werden unter den Handelsnamen Esperase®, beziehungsweise Savinase® von der Firma Novozymes vertrieben. Von der Protease aus *Bacillus lentus* DSM 5483 leiten sich die unter der Bezeichnung BLAP® geführten Protease-Varianten ab. Weitere bevorzugte Proteasen sind ferner beispielsweise die unter der Bezeichnung PUR geführten Enzyme. Weitere Proteasen sind ferner die unter den Handelsnamen Durazym®, Release®, Everlase®, Nafizym®, Natalase®, Kannase® und Ovozyme® von der Firma Novozymes, die unter den Handelsnamen, Purafect®, Purafect® OXP, Purafect® Prime, Excellase® und Properase® von der Firma Genencor, das unter dem Handelsnamen Protosol® von der Firma Advanced Biochemicals Ltd., Thane, Indien, das unter dem Handelsnamen Wuxi® von der Firma Wuxi Snyder Bioproducts Ltd., China, die unter den Handelsnamen Proleather® und Protease P® von der Firma Amano Pharmaceuticals Ltd., Nagoya, Japan, und das unter der Bezeichnung Proteinase K-16 von der Firma Kao Corp., Tokyo, Japan, erhältlichen Enzyme. Bevorzugt sind ferner auch die Proteasen aus *Bacillus gibsonii* und *Bacillus pumilus*, die offenbart sind in den internationalen Patentanmeldungen WO2008/086916 und WO2007/131656.

Beispiele für Amylasen sind die α -Amylasen aus *Bacillus licheniformis*, aus *Bacillus amyloliquefaciens* oder aus *Bacillus stearothermophilus* sowie insbesondere auch deren für den Einsatz in Wasch- oder Reinigungsmitteln verbesserte Weiterentwicklungen. Das Enzym aus

Bacillus licheniformis ist von dem Unternehmen Novozymes unter dem Namen Termamyl® und von dem Unternehmen Danisco/Genencor unter dem Namen Purastar®ST erhältlich. Weiterentwicklungsprodukte dieser α -Amylase sind von dem Unternehmen Novozymes unter den Handelsnamen Duramyl® und Termamyl®ultra, von dem Unternehmen Danisco/Genencor unter dem Namen Purastar®OxAm und von dem Unternehmen Daiwa Seiko Inc., Tokyo, Japan, als Keistase® erhältlich. Die α -Amylase von *Bacillus amyloliquefaciens* wird von dem Unternehmen Novozymes unter dem Namen BAN® vertrieben, und abgeleitete Varianten von der α -Amylase aus *Bacillus stearothermophilus* unter den Namen BSG® und Novamyl®, ebenfalls von dem Unternehmen Novozymes. Des Weiteren sind die α -Amylase aus *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) und die Cyclodextrin-Glucanotransferase (CGTase) aus *Bacillus agaradherens* (DSM 9948) zu nennen. Ebenso sind Fusionsprodukte aller genannten Moleküle einsetzbar. Darüber hinaus sind die unter den Handelsnamen Fungamyl® von dem Unternehmen Novozymes erhältlichen Weiterentwicklungen der α -Amylase aus *Aspergillus niger* und *A. oryzae* geeignet. Weitere vorteilhafte Handelsprodukte sind beispielsweise die Amylase Powerase® von dem Unternehmen Danisco/Genencor und die Amylasen Amylase-LT®, Stainzyme® und Stainzyme plus®, letztere von dem Unternehmen Novozymes. Auch durch Punktmutationen erhältliche Varianten dieser Enzyme können erfindungsgemäß hergestellt werden. Weitere bevorzugte Amylasen sind offenbart in den internationalen Offenlegungsschriften WO 00/60060, WO 03/002711, WO 03/054177 und WO07/079938, auf deren Offenbarung daher ausdrücklich verwiesen wird bzw. deren diesbezüglicher Offenbarungsgehalt daher ausdrücklich in die vorliegende Patentanmeldung mit einbezogen wird. Erfindungsgemäß herzustellende Amylasen sind ferner vorzugsweise α -Amylasen.

Beispiele für Lipasen oder Cutinasen sind die ursprünglich aus *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*) erhältlichen, beziehungsweise weiterentwickelten Lipasen, insbesondere solche mit dem Aminosäureaustausch D96L. Sie werden beispielsweise von der Firma Novozymes unter den Handelsnamen Lipolase®, Lipolase®Ultra, LipoPrime®, Lipozyme® und Lipex® vertrieben. Des Weiteren sind beispielsweise die Cutinasen herstellbar, die ursprünglich aus *Fusarium solani pisi* und *Humicola insolens* isoliert worden sind. Von der Firma Danisco/Genencor sind beispielsweise die Lipasen beziehungsweise Cutinasen herstellbar, deren Ausgangsenzyme ursprünglich aus *Pseudomonas mendocina* und *Fusarium solanii* isoliert worden sind. Als weitere wichtige Handelsprodukte sind die ursprünglich von der Firma Gist-Brocades (inzwischen Danisco/Genencor) vertriebenen Präparationen M1 Lipase® und Lipomax® und die von der Firma Meito Sangyo KK, Japan, unter den Namen Lipase MY-30®, Lipase OF® und Lipase PL® vertriebenen Enzyme zu erwähnen, ferner das Produkt Lumafast® von der Firma Danisco/Genencor.

Beispiele für Cellulasen (Endoglucanasen, EG) umfassen Sequenzen der pilzlichen, Endoglucanase(EG)-reichen Cellulase-Präparation beziehungsweise deren Weiterentwicklungen, die von dem Unternehmen Novozymes unter dem Handelsnamen Celluzyme® angeboten wird. Die ebenfalls von dem Unternehmen Novozymes erhältlichen Produkte Endolase® und Carezyme® basieren auf der 50 kD-EG, beziehungsweise der 43 kD-EG aus *Humicola insolens* DSM 1800. Weitere herstellbare Handelsprodukte dieses Unternehmens sind Cellusoft®, Renozyme® und Celluclean®. Weiterhin herstellbar sind beispielsweise Cellulasen, die von dem Unternehmen AB Enzymes, Finnland, unter den Handelsnamen Ecostone® und Biotouch® erhältlich sind, und die zumindest zum Teil auf der 20 kD-EG aus *Melanocarpus* basieren. Weitere Cellulasen von dem Unternehmen AB Enzymes sind Econase® und Ecopulp®. Weitere geeignete Cellulasen sind aus *Bacillus* sp. CBS 670.93 und CBS 669.93, wobei die aus *Bacillus* sp. CBS 670.93 von dem Unternehmen Danisco/Genencor unter dem Handelsnamen Puradax® erhältlich ist. Weitere herstellbare Handelsprodukte des Unternehmens Danisco/Genencor sind „Genencor detergent cellulase L“ und IndiAge®Neutra.

Auch durch Punktmutationen erhältliche Varianten dieser Enzyme können erfindungsgemäß hergestellt werden. Besonders bevorzugte Cellulasen sind *Thielavia terrestris* Cellulasevarianten, die in der internationalen Offenlegungsschrift WO 98/12307 offenbart sind, Cellulasen aus *Melanocarpus*, insbesondere *Melanocarpus albomyces*, die in der internationalen Offenlegungsschrift WO 97/14804 offenbart sind, Cellulasen vom EGIII-Typ aus *Trichoderma reesei*, die in der europäischen Patentanmeldung EP 1 305 432 offenbart sind bzw. hieraus erhältliche Varianten, insbesondere diejenigen, die offenbart sind in den europäischen Patentanmeldungen EP 1240525 und EP 1305432, sowie Cellulasen, die offenbart sind in den internationalen Offenlegungsschriften WO 1992006165, WO 96/29397 und WO 02/099091. Auf deren jeweilige Offenbarung wird daher ausdrücklich verwiesen bzw. deren diesbezüglicher Offenbarungsgehalt wird daher ausdrücklich in die vorliegende Patentanmeldung mit einbezogen.

Ferner können weitere Enzyme hergestellt werden, die unter dem Begriff Hemicellulasen zusammengefasst werden. Hierzu gehören beispielsweise Mannanasen, Xanthanlyasen, Xanthanasen, Xyloglucanasen, Xylanasen, Pullulanasen, Pektin-spaltende Enzyme und β -Glucanasen. Die aus *Bacillus subtilis* gewonnene β -Glucanase ist unter dem Namen Cereflo® von der Firma Novozymes erhältlich. Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Hemicellulasen sind Mannanasen, welche beispielsweise unter den Handelsnamen Mannaway® von dem Unternehmen Novozymes oder Purabrite® von dem Unternehmen Genencor vertrieben werden. Zu den Pektin-spaltenden Enzymen werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung ebenfalls Enzyme gezählt mit den Bezeichnungen Pektinase, Pektatlyase, Pektinesterase, Pektindemethoxylase, Pektinmethoxylase, Pektinmethylesterase, Pektase, Pektinmethylesterase, Pektinoesterase, Pektinpektylhydrolase, Pektindepolymerase, Endopolygalacturonase, Pektolase,

Pektinhydrolase, Pektin-Polygalacturonase, Endo-Polygalacturonase, Poly- α -1,4-Galacturonid Glycanohydrolase, Endogalacturonase, Endo-D-galacturonase, Galacturan 1,4- α -Galacturonidase, Exopolygalacturonase, Poly(galacturonat) Hydrolase, Exo-D-Galacturonase, Exo-D-Galacturonanase, Exopoly-D-Galacturonase, Exo-poly- α -Galacturonosidase, Exopolygalacturonosidase oder Exopolygalacturanosidase. Beispiele für diesbezüglich geeignete Enzyme sind beispielsweise unter den Namen Gamanase®, Pektinex AR®, X-Pect® oder Pectaway® von dem Unternehmen Novozymes, unter den Namen Rohapect UF®, Rohapect TPL®, Rohapect PTE100®, Rohapect MPE®, Rohapect MA plus HC, Rohapect DA12L®, Rohapect 10L®, Rohapect B1L® von dem Unternehmen AB Enzymes und unter dem Namen Pyrolase® von dem Unternehmen Diversa Corp., San Diego, CA, USA erhältlich.

Ferner können auch Oxidoreduktasen, beispielsweise Oxidasen, Oxygenasen, Katalasen, Peroxidasen, wie Halo-, Chloro-, Bromo-, Lignin-, Glucose- oder Manganperoxidasen, Dioxygenasen oder Laccasen (Phenoloxidasen, Polyphenoloxidasen) hergestellt werden. Als geeignete Handelsprodukte sind Denilite® 1 und 2 der Firma Novozymes zu nennen. Weitere Enzyme sind in den internationalen Patentanmeldungen WO 98/45398, WO 2005/056782, WO 2004/058961 sowie WO 2005/124012 offenbart.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist die weitere Aminosäuresequenz nicht natürlicherweise zusammen mit dem Signalpeptid in einer Polypeptidkette in einem Mikroorganismus vorhanden. Folglich handelt es sich bei dem von der Nukleinsäuresequenz b) codierten Protein um ein rekombinantes Protein. Nicht natürlicherweise vorhanden bedeutet daher, dass die beiden Aminosäuresequenzen keine Bestandteile eines eigenen Proteins des Mikroorganismus sind. Ein Protein, welches das Signalpeptid und die weitere Aminosäuresequenz umfasst, kann folglich in dem Mikroorganismus nicht von einer Nukleinsäuresequenz exprimiert werden, die Teil der chromosomalen DNA des Mikroorganismus in seiner Wildtyp-Form ist. Ein derartiges Protein und/oder die hierfür jeweils codierende Nukleinsäuresequenz ist folglich in der Wildtyp-Form des Mikroorganismus nicht vorhanden und/oder kann aus der Wildtyp-Form des Mikroorganismus nicht isoliert werden. Beide Sequenzen – Signalpeptid und weitere Aminosäuresequenz – müssen in einer Wildtyp-Form eines Mikroorganismus daher zwei unterschiedlichen Polypeptidketten zugeordnet sein, sofern sie überhaupt beide in der Wildtyp-Form eines Mikroorganismus vorhanden sind bzw. sein können. Im Rahmen dieser Ausgestaltung der Erfindung wurden daher Signalpeptid und weitere Aminosäuresequenz bzw. die für sie codierenden Nukleinsäuren mit Hilfe gentechnischer Verfahren neu kombiniert, und diese Kombination von Signalpeptid und weiterer Aminosäuresequenz existiert in der Natur nicht. In der Wildtyp-Form eines Mikroorganismus ist eine derartige Verknüpfung von dem Signalpeptid mit der weiteren Aminosäuresequenz folglich nicht vorhanden, und zwar weder auf DNA- noch auf Proteinebene. Das Signalpeptid wie auch die weitere Aminosäuresequenz bzw. die hierfür jeweils

codierenden Nukleinsäuresequenzen können aber jeweils natürlichen Ursprungs sein, jedoch existiert deren Kombination in der Natur nicht. Signalpeptid und weitere Aminosäuresequenz selbst können aber aus dem gleichen Mikroorganismus oder auch aus verschiedenen Mikroorganismen stammen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, dass sie eine nicht natürliche Nukleinsäure ist. Nicht natürlich bedeutet, dass eine erfindungsgemäße Nukleinsäure nicht aus einem in der Natur vorkommenden Organismus in seiner Wildtyp-Form isoliert werden kann. Insbesondere und bezogen auf Wildtyp-Bakterien ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure daher keine bakterieneigene Nukleinsäure.

Bevorzugt stammen die Sequenzen (a) und (b) nicht von demselben bzw. denselben Organismen, insbesondere Bakterien, sondern stammen von unterschiedlichen Organismen, insbesondere Bakterien. Unterschiedliche Bakterien sind beispielsweise Bakterien, die unterschiedlichen Stämmen oder Arten oder Gattungen angehören.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist der Expressionsvektor dadurch gekennzeichnet, dass das Signalpeptid N-terminal von der weiteren Aminosäuresequenz in dem von der Nukleinsäuresequenz b) codierten Protein angeordnet ist. Das von der Nukleinsäuresequenz b) codierte Protein weist daher folgende Struktur auf: N-Terminus – Signalpeptid – (optionale zusätzliche Aminosäuresequenz) – weitere Aminosäuresequenz – C-Terminus. Eine derartige Struktur des zu exprimierenden Proteins hat sich als besonders vorteilhaft herausgestellt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist der Expressionsvektor dadurch gekennzeichnet, dass das von der Nukleinsäuresequenz b) codierte Protein ferner eine Verbindungssequenz umfasst, die zwischen dem Signalpeptid und der weiteren Aminosäuresequenz des Proteins angeordnet ist. Das von der Nukleinsäuresequenz b) codierte Protein weist daher folgende Struktur auf: N-Terminus – Signalpeptid – Verbindungssequenz (auch „Kupplung“ oder „Spacer“) – weitere Aminosäuresequenz – C-Terminus. Eine derartige Struktur des zu exprimierenden Proteins hat sich ebenfalls als besonders vorteilhaft herausgestellt. Vorzugsweise weist die Verbindungssequenz eine Länge zwischen 1 und 50 Aminosäuren, zwischen 2 und 25 Aminosäuren, zwischen 2 und 15 Aminosäuren, zwischen 3 und 10 Aminosäuren und besonders bevorzugt zwischen 3 und 5 Aminosäuren auf. Ein Beispiel für eine besonders bevorzugte Verbindungssequenz ist die Aminosäureabfolge Alanin, Glutaminsäure und Phenylalanin (vom N- zum C-Terminus).

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist der Expressionsvektor dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäuresequenz einer Protease umfasst, wobei die Aminosäuresequenz der Protease

mindestens zu 80% identisch zu SEQ ID NO. 7 ist. Bevorzugt ist die Aminosäuresequenz der Protease mindestens zu 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch zu SEQ ID NO. 7.

Alternativ umfasst die weitere Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäuresequenz einer Protease, die mindestens zu 80% identisch zu SEQ ID NO. 8 ist. Bevorzugt ist die Aminosäuresequenz der Protease zu mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch zu SEQ ID NO. 8.

Alternativ umfasst die weitere Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäuresequenz einer Protease, die mindestens zu 80% identisch zu SEQ ID NO. 9 ist. Bevorzugt ist die Aminosäuresequenz der Protease zu mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch zu SEQ ID NO. 9.

Alternativ umfasst die weitere Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäuresequenz einer Protease, die mindestens zu 80% identisch zu SEQ ID NO. 10 ist und an Position 99 in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 10 die Aminosäure Glutaminsäure (E) oder Asparaginsäure (D) aufweist. Bevorzugt ist die Aminosäuresequenz der Protease zu mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt identisch zu SEQ ID NO. 10 in den Positionen 1 bis 98 und 100 bis 269 in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 10.

Alternativ umfasst die weitere Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäuresequenz einer Protease, die mindestens zu 80% identisch zu SEQ ID NO. 10 ist und an Position 99 in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 10 die Aminosäure Glutaminsäure (E) oder Asparaginsäure (D) aufweist und ferner in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 10 mindestens eine der folgenden Aminosäuren aufweist:

- (a) Threonin an Position 3 (3T),
- (b) Isoleucin an Position 4 (4I),
- (c) Alanin, Threonin oder Arginin an Position 61 (61A, 61T oder 61R),
- (d) Asparaginsäure oder Glutaminsäure an Position 154 (154D oder 154E),
- (e) Prolin an Position 188 (188P),
- (f) Methionin an Position 193 (193M),
- (g) Isoleucin an Position 199 (199I),
- (h) Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Glycin an Position 211 (211D, 211E oder 211G),

- (i) Kombinationen der Aminosäuren (a) bis (h).

Bevorzugt ist die Aminosäuresequenz dieser Protease zu mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% und ganz besonders bevorzugt identisch zu SEQ ID NO. 10 in allen nicht veränderten oder nicht für eine Veränderung vorgesehenen Positionen. Ganz besonders bevorzugt umfasst die weitere Aminosäuresequenz des Proteins daher die Aminosäuresequenz einer Protease, die eine gegenüber SEQ ID NO. 10 in mindestens zwei Positionen veränderte Aminosäuresequenz aufweist, wobei die erste Veränderung in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 10 Glutaminsäure an Position 99 ist und die zweite Veränderung in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 10 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) Threonin an Position 3 (3T),
- (b) Isoleucin an Position 4 (4I),
- (c) Alanin, Threonin oder Arginin an Position 61 (61A, 61T oder 61R),
- (d) Asparaginsäure oder Glutaminsäure an Position 154 (154D oder 154E),
- (e) Prolin an Position 188 (188P),
- (f) Methionin an Position 193 (193M),
- (g) Isoleucin an Position 199 (199I),
- (h) Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Glycin an Position 211 (211D, 211E oder 211G),
- (i) Kombinationen der Aminosäuren (a) bis (h).

Ebenfalls ganz besonders bevorzugt umfasst die weitere Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäuresequenz einer Protease, die eine gegenüber SEQ ID NO. 10 in mindestens zwei Positionen veränderte Aminosäuresequenz aufweist, wobei die erste Veränderung in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 10 Asparaginsäure an Position 99 ist und die zweite Veränderung in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 10 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) Threonin an Position 3 (3T),
- (b) Isoleucin an Position 4 (4I),
- (c) Alanin, Threonin oder Arginin an Position 61 (61A, 61T oder 61R),
- (d) Asparaginsäure oder Glutaminsäure an Position 154 (154D oder 154E),
- (e) Prolin an Position 188 (188P),
- (f) Methionin an Position 193 (193M),
- (g) Isoleucin an Position 199 (199I),
- (h) Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Glycin an Position 211 (211D, 211E oder 211G),
- (i) Kombinationen der Aminosäuren (a) bis (h).

Es wurde festgestellt, dass auch die vorstehend genannten Proteasen mit erfindungsgemäßen Expressionsvektoren besonders vorteilhaft hergestellt werden können. Für derartige

Ausführungsformen der Erfindung hat sich herausgestellt, dass sich mit solchen Kombinationen von Signalpeptiden und Subtilisinen besonders gute Produktausbeuten in einer Fermentation erzielen lassen. Angegeben sind diesbezüglich die Aminosäuresequenzen der reifen Proteasen, also der fertig prozessierten Produkte. In einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor können diesbezüglich auch weitere Sequenzen der immaturren Protease, insbesondere beispielsweise Propeptide, mit umfasst sein. In einem solchen Fall umfasst die weitere Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäuresequenz der Protease und des Propeptids. Eine weitere Ausgestaltung der Erfindung ist folglich dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäuresequenz einer Protease, insbesondere einer Protease wie vorstehend beschrieben, nebst einem bzw. ihrem Propeptid umfasst.

Generell gilt, dass die weitere Aminosäuresequenz des Proteins nicht lediglich die Aminosäuresequenz eines reifen Proteins umfassen muss; vielmehr können weitere Aminosäuresequenzen wie beispielsweise Propeptide von dieser Aminosäuresequenz mit umfasst sein. Dies gilt nicht nur für Proteasen, sondern für alle Proteine, insbesondere auch alle anderen Arten von Enzymen.

Erfindungsgemäße Nukleinsäuren und Expressionsvektoren können über an sich bekannte Verfahren zur Veränderung von Nukleinsäuren erzeugt werden. Solche sind beispielsweise in einschlägigen Handbüchern wie dem von Fritsch, Sambrook und Maniatis, „Molecular cloning: a laboratory manual“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989, dargestellt und dem Fachmann auf dem Gebiet der Biotechnologie geläufig. Beispiele für solche Verfahren sind die chemische Synthese oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), optional in Verbindung mit weiteren molekularbiologischen und/oder chemischen bzw. biochemischen Standardmethoden.

Mit allen genannten Erfindungsgegenständen und Ausführungsformen sind als weitere Erfindungsgegenstände nicht menschliche Wirtszellen, die erfindungsgemäße Vektoren beinhalten, Herstellungsverfahren, in denen entsprechende Wirtszellen eingesetzt werden sowie Verwendungen entsprechender Vektoren oder Wirtszellen verbunden. Daher betreffen die vorstehenden Ausführungen diese Erfindungsgegenstände entsprechend.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine nicht menschliche Wirtszelle, die einen erfindungsgemäßen Expressionsvektor beinhaltet. Ein erfindungsgemäßer Expressionsvektor wird bevorzugt in die Wirtszelle eingebracht durch deren Transformation. Erfindungsgemäß bevorzugt erfolgt dieses dadurch, dass in einen Mikroorganismus ein erfindungsgemäßer Vektor transformiert wird, der dann eine erfindungsgemäße Wirtszelle darstellt. Alternativ können auch einzelne Komponenten, d.h. Nukleinsäure-Teile bzw. -Fragmente, beispielsweise die Komponenten (a) und/oder (b) eines erfindungsgemäßen Vektors, derart in eine Wirtszelle eingebracht werden, dass die dann resultierende Wirtszelle einen erfindungsgemäßen Vektor enthält. Dieses Vorgehen

eignet sich besonders dann, wenn die Wirtszelle bereits einen oder mehrere Bestandteile eines erfindungsgemäßen Vektors enthält und die weiteren Bestandteile dann entsprechend ergänzt werden. Verfahren zur Transformation von Zellen sind im Stand der Technik etabliert und dem Fachmann hinlänglich bekannt. Als Wirtszellen eignen sich prinzipiell alle Zellen, das heißt prokaryotische oder eukaryotische Zellen. Bevorzugt sind solche Wirtszellen, die sich genetisch vorteilhaft handhaben lassen, was beispielsweise die Transformation mit dem Vektor und dessen stabile Etablierung angeht, beispielsweise einzellige Pilze oder Bakterien. Ferner zeichnen sich bevorzugte Wirtszellen durch eine gute mikrobiologische und biotechnologische Handhabbarkeit aus. Das betrifft beispielsweise leichte Kultivierbarkeit, hohe Wachstumsraten, geringe Anforderungen an Fermentationsmedien und gute Produktions- und Sekretionsraten für Fremdproteine. Häufig müssen aus der Fülle an verschiedenen im Stand der Technik zur Verfügung stehenden Systemen die optimalen Expressionssysteme für den Einzelfall experimentell ermittelt werden.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen stellen solche Wirtszellen dar, die aufgrund genetischer Regulationselemente, die beispielsweise auf dem Vektor zur Verfügung gestellt werden, aber auch von vornherein in diesen Zellen vorhanden sein können, in ihrer Aktivität regulierbar sind. Beispielsweise durch kontrollierte Zugabe von chemischen Verbindungen, die als Aktivatoren dienen, durch Änderung der Kultivierungsbedingungen oder bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte können diese zur Expression angeregt werden. Dies ermöglicht eine wirtschaftliche Produktion der Proteine.

Bevorzugte Wirtszellen sind prokaryontische oder bakterielle Zellen. Bakterien zeichnen sich durch kurze Generationszeiten und geringe Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen aus. Dadurch können kostengünstige Verfahren etabliert werden. Zudem verfügt der Fachmann bei Bakterien in der Fermentationstechnik über einen reichhaltigen Erfahrungsschatz. Für eine spezielle Produktion können aus verschiedensten, im Einzelfall experimentell zu ermittelnden Gründen wie Nährstoffquellen, Produktbildungsrate, Zeitbedarf usw., gramnegative oder grampositive Bakterien geeignet sein.

Bei gramnegativen Bakterien wie beispielsweise *Escherichia coli* wird eine Vielzahl von Polypeptiden in den periplasmatischen Raum sezerniert, also in das Kompartiment zwischen den beiden die Zellen einschließenden Membranen. Dies kann für spezielle Anwendungen vorteilhaft sein. Ferner können auch gramnegative Bakterien so ausgestaltet werden, dass sie die exprimierten Polypeptide nicht nur in den periplasmatischen Raum, sondern in das das Bakterium umgebende Medium ausschleusen. Grampositive Bakterien wie beispielsweise Bacilli oder Actinomyceten oder andere Vertreter der Actinomycetales besitzen demgegenüber keine äußere Membran, so dass sezernierte Proteine sogleich in das die Bakterien umgebende Medium, in der

Regel das Nährmedium, abgegeben werden, aus welchem sich die exprimierten Polypeptide aufreinigen lassen. Sie können aus dem Medium direkt isoliert oder weiter prozessiert werden. Zudem sind grampositive Bakterien mit den meisten Herkunftsorganismen für technisch wichtige Enzyme verwandt oder identisch und bilden meist selbst vergleichbare Enzyme, so dass sie über eine ähnliche Codon-Usage verfügen und ihr Protein-Syntheseapparat naturgemäß entsprechend ausgerichtet ist.

Unter Codon-Usage wird die Übersetzung des genetischen Codes in Aminosäuren verstanden, d.h. welche Nukleotidfolge (Triplett oder Basentriplett) für welche Aminosäure bzw. für welche Funktion, beispielsweise Beginn und Ende des zu translatierenden Bereichs, Bindungsstellen für verschiedene Proteine, usw., kodiert. So besitzt jeder Organismus, insbesondere jeder Produktionsstamm eine bestimmte Codon-Usage. Es kann zu Engpässen in der Proteinbiosynthese kommen, wenn die auf der transgenen Nukleinsäure liegenden Codons in der Wirtszelle einer vergleichsweise geringen Zahl von beladenen tRNAs gegenüberstehen. Synonyme Codons codieren dagegen für dieselben Aminosäuren und können in Abhängigkeit vom Wirt besser translatiert werden. Dieses gegebenenfalls notwendige Umschreiben hängt somit von der Wahl des Expressionssystems ab. Insbesondere bei Proben aus unbekanntem, eventuell nicht kultivierbarem Organismus kann eine entsprechende Anpassung notwendig sein.

Die vorliegende Erfindung ist prinzipiell auf alle Mikroorganismen, insbesondere auf alle fermentierbaren Mikroorganismen, besonders bevorzugt auf solche der Gattung *Bacillus*, anwendbar und führt dazu, dass sich durch den Einsatz solcher Mikroorganismen als Produktionsorganismen eine erhöhte Produktausbeute in einer Fermentation verwirklichen lässt. Solche Mikroorganismen stellen bevorzugte Wirtszellen im Sinne der Erfindung dar.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist die Wirtszelle daher dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Bakterium ist, bevorzugt eines, das ausgewählt ist aus der Gruppe der Gattungen von *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebakterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* und *Pseudomonas*, weiter bevorzugt eines, das ausgewählt ist aus der Gruppe von *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* und *Stenotrophomonas maltophilia*. Ganz besonders bevorzugt ist *Bacillus licheniformis*.

Die Wirtszelle kann aber auch eine eukaryontische Zelle sein, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen Zellkern besitzt. Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellt daher eine Wirtszelle dar, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen Zellkern besitzt.

Im Gegensatz zu prokaryontischen Zellen sind eukaryontische Zellen in der Lage, das gebildete Protein posttranslational zu modifizieren. Beispiele dafür sind Pilze wie Actinomyceten oder Hefen wie *Saccharomyces* oder *Kluyveromyces*. Dies kann beispielsweise dann besonders vorteilhaft sein, wenn die Proteine im Zusammenhang mit ihrer Synthese spezifische Modifikationen erfahren sollen, die derartige Systeme ermöglichen. Zu den Modifikationen, die eukaryontische Systeme besonders im Zusammenhang mit der Proteinsynthese durchführen, gehören beispielsweise die Bindung niedermolekularer Verbindungen wie Membrananker oder Oligosaccharide. Derartige Oligosaccharid-Modifikationen können beispielsweise zur Senkung der Allergenizität eines exprimierten Proteins wünschenswert sein. Auch eine Coexpression mit den natürlicherweise von derartigen Zellen gebildeten Enzymen, wie beispielsweise Cellulasen, kann vorteilhaft sein. Ferner können sich beispielsweise thermophile pilzliche Expressionssysteme besonders zur Expression temperaturbeständiger Varianten eignen.

Als Produkte, die während der Fermentation gebildet werden, werden im Rahmen der Erfindung Proteine betrachtet, die von der Nukleinsäuresequenz (b) codiert werden, insbesondere solche, wie sie vorstehend beschrieben sind. Bevorzugt handelt es sich hierbei daher um Enzyme, besonders bevorzugt um Proteasen und ganz besonders bevorzugt um Subtilisine.

Die Wirtszellen können ferner hinsichtlich ihrer Anforderungen an die Kulturbedingungen verändert sein, andere oder zusätzliche Selektionsmarker aufweisen oder andere oder zusätzliche Proteine exprimieren. Es kann sich insbesondere um solche Wirtszellen handeln, die mehrere Proteine oder Enzyme exprimieren. Bevorzugt sezernieren sie diese in das die Wirtszellen umgebende Medium.

Die erfindungsgemäßen Wirtszellen werden in an sich bekannter Weise kultiviert und fermentiert, beispielsweise in diskontinuierlichen oder kontinuierlichen Systemen. Im ersten Fall wird ein geeignetes Nährmedium mit den Wirtszellen beimpft und das Produkt nach einem experimentell zu ermittelnden Zeitraum aus dem Medium geerntet. Kontinuierliche Fermentationen zeichnen sich durch Erreichen eines Fließgleichgewichts aus, in dem über einen vergleichsweise langen Zeitraum Zellen teilweise absterben aber auch nachwachsen und gleichzeitig Produkt aus dem Medium entnommen werden kann.

Erfindungsgemäße Wirtszellen werden bevorzugt verwendet, um Proteine herzustellen, die von der Nukleinsäuresequenz (b) codiert werden. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins umfassend

- a) Kultivieren einer erfindungsgemäßen Wirtszelle
- b) Isolieren des Proteins aus dem Kulturmedium oder aus der Wirtszelle.

Dieser Erfindungsgegenstand umfasst bevorzugt Fermentationsverfahren. Fermentationsverfahren sind an sich aus dem Stand der Technik bekannt und stellen den eigentlichen großtechnischen Produktionsschritt dar, in der Regel gefolgt von einer geeigneten Aufreinigungsmethode des hergestellten Produktes, beispielsweise des Proteins. Alle Fermentationsverfahren, die auf einem entsprechenden Verfahren zur Herstellung eines Proteins beruhen, stellen Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstandes dar.

Hierbei müssen die jeweils optimalen Bedingungen für die Herstellungsverfahren, insbesondere die optimalen Kulturbedingungen für die benutzten Wirtszellen, nach dem Wissen des Fachmanns experimentell ermittelt werden, beispielsweise hinsichtlich Fermentationsvolumen und/oder Medienzusammensetzung und/oder Sauerstoffversorgung und/oder Rührergeschwindigkeit.

Fermentationsverfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Fermentation über eine Zulaufstrategie durchgeführt wird, kommen insbesondere in Betracht. Hierbei werden die Medienbestandteile, die durch die fortlaufende Kultivierung verbraucht werden, zugefüttert; man spricht auch von einer Zufütterungsstrategie. Hierdurch können beträchtliche Steigerungen sowohl in der Zelldichte als auch in der Zellmasse bzw. Trockenmasse und/oder vor allem der Aktivität des interessierenden Proteins, vorzugsweise Enzyms, erreicht werden.

Ferner kann die Fermentation auch so gestaltet werden, dass unerwünschte Stoffwechselprodukte herausgefiltert oder durch Zugabe von Puffer oder jeweils passende Gegenionen neutralisiert werden.

Das hergestellte Protein kann aus dem Fermentationsmedium geerntet werden. Ein solches Fermentationsverfahren ist gegenüber einer Isolation des Polypeptids aus der Wirtszelle, d.h. einer Produktaufbereitung aus der Zellmasse (Trockenmasse) vorteilhaft. Erfindungsgemäß werden mit den Signalpeptiden diesbezüglich geeignete Sekretionsmarker zur Verfügung gestellt.

Alle vorstehend ausgeführten Sachverhalte können zu Verfahren kombiniert werden, um Proteine herzustellen. Es ist diesbezüglich eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten von Verfahrensschritten denkbar. Das optimale Verfahren muss für jeden konkreten Einzelfall ermittelt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Expressionsvektors oder einer erfindungsgemäßen Wirtszelle zur Herstellung eines Proteins.

Alle Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die vorstehend bereits beschrieben sind, sind auch auf diese Erfindungsgegenstände anwendbar. Daher wird an dieser Stelle ausdrücklich auf die Offenbarung an entsprechender Stelle verwiesen mit dem Hinweis, dass diese Offenbarung auch für die erfindungsgemäßen Verwendungen gilt (Verwendung des Vektors bzw. der Wirtszelle).

Beispiele:

Alle molekularbiologischen Arbeitsschritte folgen Standardmethoden, wie sie beispielsweise in dem Handbuch von Fritsch, Sambrook und Maniatis „Molecular cloning: a laboratory manual“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989, oder vergleichbaren einschlägigen Werken angegeben sind. Enzyme und Baukästen (Kits) wurden nach den Angaben der jeweiligen Hersteller eingesetzt.

Beispiel 1: Herstellung erfindungsgemäßer Expressionsvektoren

Das Plasmid pBSMuL3 (Brockmeier *et al.*, 2006) wurde durch SacI-Restriktion und anschließende Religation um den E.coli-Anteil verkürzt. Das resultierende Plasmid, pBSMuL5 (vgl. Figur 1) diente als Vektor zur Klonierung der Proteasen inklusive Propeptid in die Schnittstellen EcoRI und BamHI. Dazu wurden die Gene der Protease gemäß SEQ ID NO. 8 mit den Primern gemäß SEQ ID NO. 11 und SEQ ID NO. 12, und der alkalischen Protease gemäß SEQ ID NO. 9 mit den Primern gemäß SEQ ID NO. 13 und SEQ ID NO. 14 amplifiziert. Die resultierenden Plasmide dienten als Vektoren zur Klonierung der Signalpeptide in die Schnittstellen HindIII und EcoRI. Das DNA-Fragment des Kontroll-Signalpeptids SubC (*B. licheniformis*, NCBI („National Center for Biotechnology Information“) Zugriffsnummer („Accession Number“): X91260.1) als „Benchmark“ wurde mit Hilfe der Primer gemäß SEQ ID NO. 15 und SEQ ID NO. 16 amplifiziert und jeweils in die HindIII und EcoRI-Schnittstellen der Plasmide kloniert, so dass Plasmide mit einer Nukleinsäuresequenz b) entstanden, die für ein Protein mit dem Signalpeptid SubC in Verbindung mit einer Protease gemäß SEQ ID NO. 8 (Plasmid 1) bzw. SEQ ID NO. 9 (Plasmid 2) codieren. Diese Plasmide dienten nachfolgend als Kontrolle bzw. „Benchmark“. Das DNA-Fragment des Signalpeptids gemäß SEQ ID NO. 2 wurde mit Hilfe der Primer gemäß SEQ ID NO. 19 und SEQ ID NO. 20, das DNA-Fragment des Signalpeptids gemäß SEQ ID NO. 4 mit den Primern gemäß SEQ ID NO. 17 und SEQ ID NO. 18, und das DNA-Fragment des Signalpeptids gemäß SEQ ID NO. 6 mit den Primern gemäß SEQ ID NO. 21 und SEQ ID NO. 22 amplifiziert. Während die DNA-Fragmente der Signalpeptide gemäß SEQ ID NO. 2 und 4 jeweils in den Vektor kloniert wurden, der für eine Protease gemäß SEQ ID NO. 8 codiert (Plasmide 3 und 4), wurde das DNA-Fragment des Signalpeptids gemäß SEQ ID NO. 6 in den Vektor eingefügt, der für eine Protease gemäß

SEQ ID NO. 9 codiert (Plasmid 5). Klonierungsbedingt wurde dabei zwischen der DNA-Sequenz des jeweiligen Signalpeptids und der DNA-Sequenz des Propeptids der jeweiligen Protease eine Sequenz von 9 Nukleotiden eingeführt, die für die Aminosäurefolge AEF kodiert (vgl. Figur 1).

Diese so genannte Verbindungssequenz beinhaltet die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease EcoRI.

Alle als Primer verwendeten Oligonukleotide sind in nachfolgender Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1:

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (in 5' → 3' Orientierung; die Unterstreichungen kennzeichnen die Restriktionsschnittstelle)	Schnittstelle
SEQ ID NO. 11	ATAT <u>GAATTC</u> GCTGAGGAAGCAAAGAAAA	EcoRI
SEQ ID NO. 12	ATAT <u>GGATCC</u> TTAGCGTGTGGCCGCTTCTGC	BamHI
SEQ ID NO. 13	ATAT <u>GAATTC</u> GCTGAGGAAGCAAAGAAAA	EcoRI
SEQ ID NO. 14	ATAT <u>GGATCC</u> TTAGCGCGTTGCTGCATCTGC	BamHI
SEQ ID NO. 15	ATATA <u>AAGCTT</u> AAGGAGGATATTATGATGAGGAAAAAGAGT TTT	HindIII
SEQ ID NO. 16	ATAT <u>GAATTC</u> AGCTGCAGAAGCGGAATCGCTGAA	EcoRI
SEQ ID NO. 17	ATATA <u>AAGCTT</u> AAGGAGGATATTATGAAAAAACTATTCAAAA CC	HindIII
SEQ ID NO. 18	ATAT <u>GAATTC</u> AGCAGCCGCCGAGATTGTGAGAA	EcoRI
SEQ ID NO. 19	ATATA <u>AAGCTT</u> AAGGAGGATATTATGGCGAAACCACTATCA AAA	HindIII
SEQ ID NO. 20	ATAT <u>GAATTC</u> AGCAGCGTCTGCCGCGGGTAAACC	EcoRI
SEQ ID NO. 21	ATATA <u>AAGCTT</u> AAGGAGGATATTATGACATTGACTAAACTG AAA	HindIII
SEQ ID NO. 22	ATAT <u>GAATTC</u> AGCGGCAAGTGCCTGACTGGAAAA	EcoRI

Beispiel 2: Expression der Proteine

Ein *Bacillus licheniformis*-Stamm wurden mit den Plasmiden 1 bis 5 transformiert, um die verschiedenen Protease-Produktionsstämme zu erhalten. Für die Inokulation von Kulturen wurden Einzelkolonien von Agarplatten verwendet, die über Nacht (ÜN) inkubiert wurden. Für die quantitative Bestimmung der Sekretionseffizienz wurden die Einzelkolonien direkt von den Agarplatten in Deepwell-MTP (Mikrotiterplatte; 96 Kavitäten mit je 1 mL selektiven LB-Medium) überführt. Dabei wurde jede Einzelkolonie parallel in mindestens zwei Kavitäten überführt, um eine Doppel- oder Dreifach-Bestimmung durch die Mehrfach-Anzucht des jeweiligen Klons zu erhalten. Für das Beimpfen der Deepwell-MTP wurden ausschließlich Klone verwendet, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Nach der Anzucht für 20 h bei 37°C im Mikrotiterplattenschüttler (Timix 5,

Firma Edmund-Bühler, Hechingen) wurden alle Klone auf LB-Agarplatten repliziert und anschließend die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert (4000 UpM, 20 min, 4°C). Alle folgenden Pipettierschritte wurden mit Hilfe von Mehrkanalpipetten (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt, wobei der „reverse pipetting“-Modus verwendet wurde und keine Volumina kleiner als 15 µl pipettiert wurden. Es wurde jeweils das kleinste Volumen in der MTP vorgelegt und die größeren Volumina dazu gegeben und die MTP bei jedem Verdünnungsschritt 10 Sekunden im Spektralphotometer „Spektramax 250“ (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) gemischt. Für die Erstellung der entsprechenden Verdünnungen wurde der Kulturüberstand per Mehrkanalpipette abgenommen und in Mikrotiterplatten (96 Kavitäten, F-Boden, glasklar, Firma Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt.

Anschließend wurde die proteolytische Aktivität in den Kulturüberständen bzw. Verdünnungen über die Freisetzung des Chromophors para-Nitroanilin (pNA) aus dem Substrat suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-Nitroanilid (suc-AAPF-pNA) bestimmt. Die Protease spaltet das Substrat und setzt pNA frei. Die Freisetzung des pNA verursacht eine Zunahme der Extinktion bei 410 nm, deren zeitlicher Verlauf ein Maß für die enzymatische Aktivität ist (vgl. Del Mar et al., Anal.Biochem., 99: 316-320, 1979).

Für die Ermittlung der Sekretionseffizienz der verschiedenen Stämme wurde in jeder MTP-Anzucht ein internes Kontroll-Konstrukt Plasmid 1 bzw. Plasmid 2) mit angezogen. Die im Kulturüberstand ermittelte proteolytische Aktivität des Stammes mit dem Kontroll-Konstrukt wurde als 100 % definiert.

Die Stämme mit den erfindungsgemäßen Plasmiden 3 und 4 erreichten verglichen mit der Kontrolle, die das Plasmid 1 enthielt, eine um 194% +/- 48 bzw. 230% +/- 38 erhöhte Proteaseaktivität (vgl. Figur 2).

Der Stamm mit dem erfindungsgemäßen Plasmid 5 erreichte verglichen mit der Kontrolle, die das Plasmid 2 enthielt, eine um 44% +/- 10 erhöhte Proteaseaktivität (vgl. Figur 3).

Beschreibung der Figuren

- Figur 1: Schema der Klonierungsstrategie im Bacillus-Expressionsvektor pBSMu5 (modifiziert nach Brockmeier et al., 2006). (A) Die DNA-Fragmente der Signalpeptide wurden am N-Terminus mit einer HindIII-Restriktionsschnittstelle, einer standardisierten Ribosomenbindestelle (RBS), gefolgt von einer Spacer-Region und dem standardisierten Startcodon für Methionin amplifiziert. Zwischen Signalpeptid und N-Terminus der zu sezernierenden Protease wurde eine Kupplung mit einem Alanin an der „+1“-Position und der EcoRI-Restriktionsschnittstelle angefügt. (B) Bacillus-Vektor pBSMu5 mit dem Hpall-Promotor, dem jeweiligen Sekretionstarget (kloniert über EcoRI und BamHI) sowie der Kanamycin-Resistenz-Kassette und dem Replikationsprotein repB für Bacillus.
- Figur 2: Relative Proteaseaktivität im Kulturüberstand von Bacillus licheniformis mit der Protease gemäß SEQ ID NO. 8 und drei verschiedenen Signalpeptiden in pBSMu5. Die proteolytische Aktivität von dem Konstrukt Plasmid 1 wurde als 100% definiert (Kontrolle). Die Werte wurden in mindestens zwei voneinander unabhängigen Anzuchten ermittelt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.
- Figur 3: Relative Proteaseaktivität im Kulturüberstand von Bacillus licheniformis mit der Protease gemäß SEQ ID NO. 9 und zwei verschiedenen Signalpeptiden in pBSMu5. Die proteolytische Aktivität von dem Konstrukt Plasmid 2 wurde als 100% definiert (Kontrolle). Die Werte wurden in mindestens zwei voneinander unabhängigen Anzuchten ermittelt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Patentansprüche

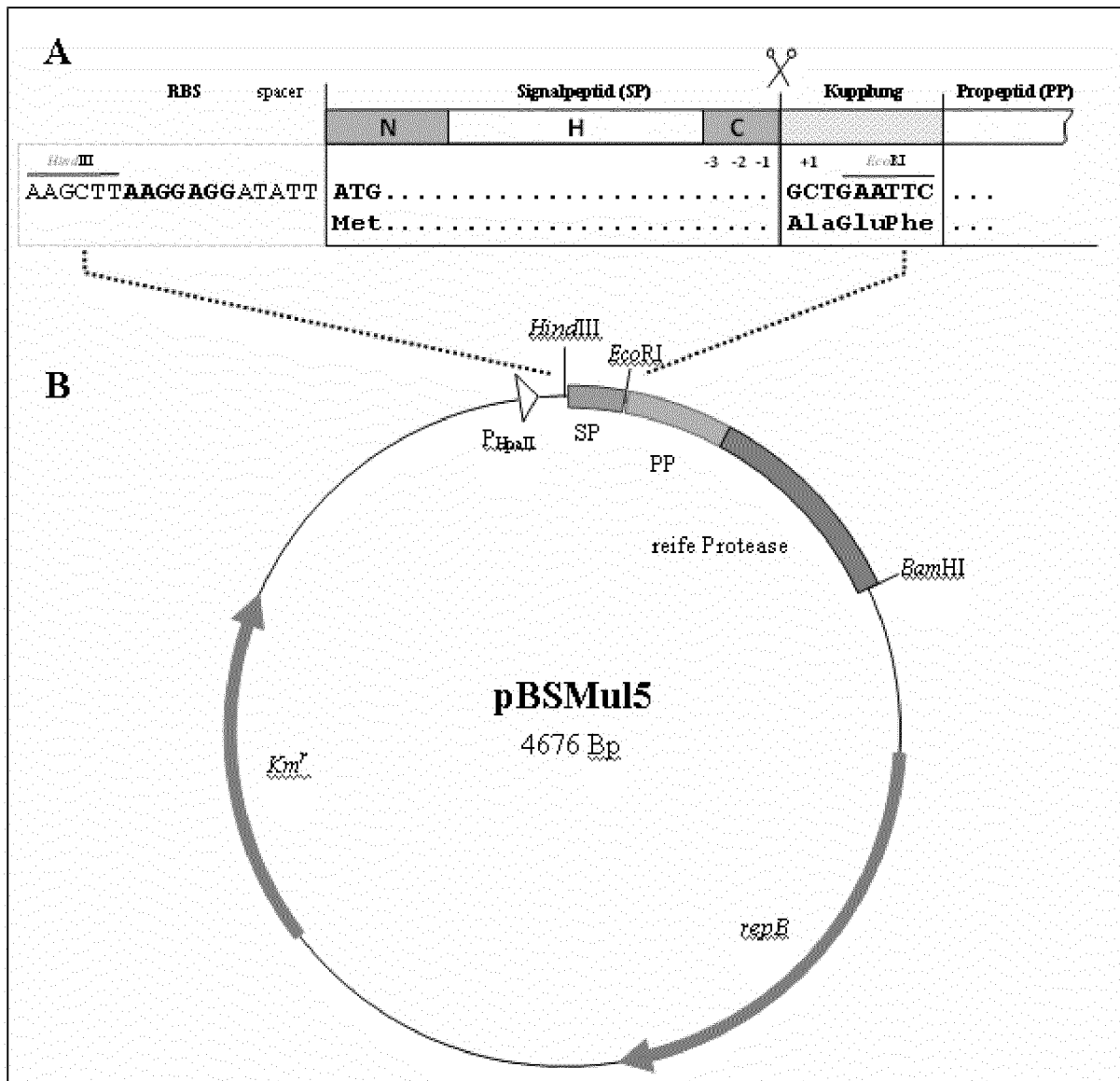
1. Expressionsvektor umfassend
 - a) eine Promotorsequenz und
 - b) eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein codiert, wobei das Protein ein Signalpeptid und eine weitere Aminosäuresequenz umfasst und das Signalpeptid eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist oder zu der in SEQ ID NO. 4 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist oder zu der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist, oder das Signalpeptid eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu mindestens einer dieser Sequenzen strukturhomolog ist.
2. Expressionsvektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das von der Nukleinsäuresequenz b) codierte Signalpeptid eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4 oder SEQ ID NO. 6 aufweist.
3. Expressionsvektor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäuresequenz eines Enzyms umfasst, insbesondere einer Protease, Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Mannanase, Tannase, Xylanase, Xanthanase, Xyloglucanase, β -Glucosidase, Pektin-spaltendes Enzym, Carrageenase, Perhydrolase, Oxidase, Oxidoreduktase oder einer Lipase.
4. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Signalpeptid N-terminal von der weiteren Aminosäuresequenz in dem von der Nukleinsäuresequenz b) codierten Protein angeordnet ist.
5. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das von der Nukleinsäuresequenz b) codierte Protein ferner eine Verbindungssequenz umfasst, die zwischen dem Signalpeptid und der weiteren Aminosäuresequenz des Proteins angeordnet ist, insbesondere wobei die Verbindungssequenz eine Länge zwischen 1 und 50 Aminosäuren aufweist.
6. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäuresequenz einer Protease umfasst, wobei die Aminosäuresequenz der Protease mindestens zu 80% identisch zu SEQ ID NO. 7 ist, oder mindestens zu 80% identisch zu SEQ ID NO. 8 ist, oder

mindestens zu 80% identisch zu SEQ ID NO. 9 ist, oder
mindestens zu 80% identisch zu SEQ ID NO. 10 ist und an Position 99 in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 10 die Aminosäure Glutaminsäure (E) oder Asparaginsäure (D) aufweist, oder
mindestens zu 80% identisch zu SEQ ID NO. 10 ist und an Position 99 in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 10 die Aminosäure Glutaminsäure (E) oder Asparaginsäure (D) aufweist und
ferner in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 10 mindestens eine der folgenden Aminosäuren aufweist:

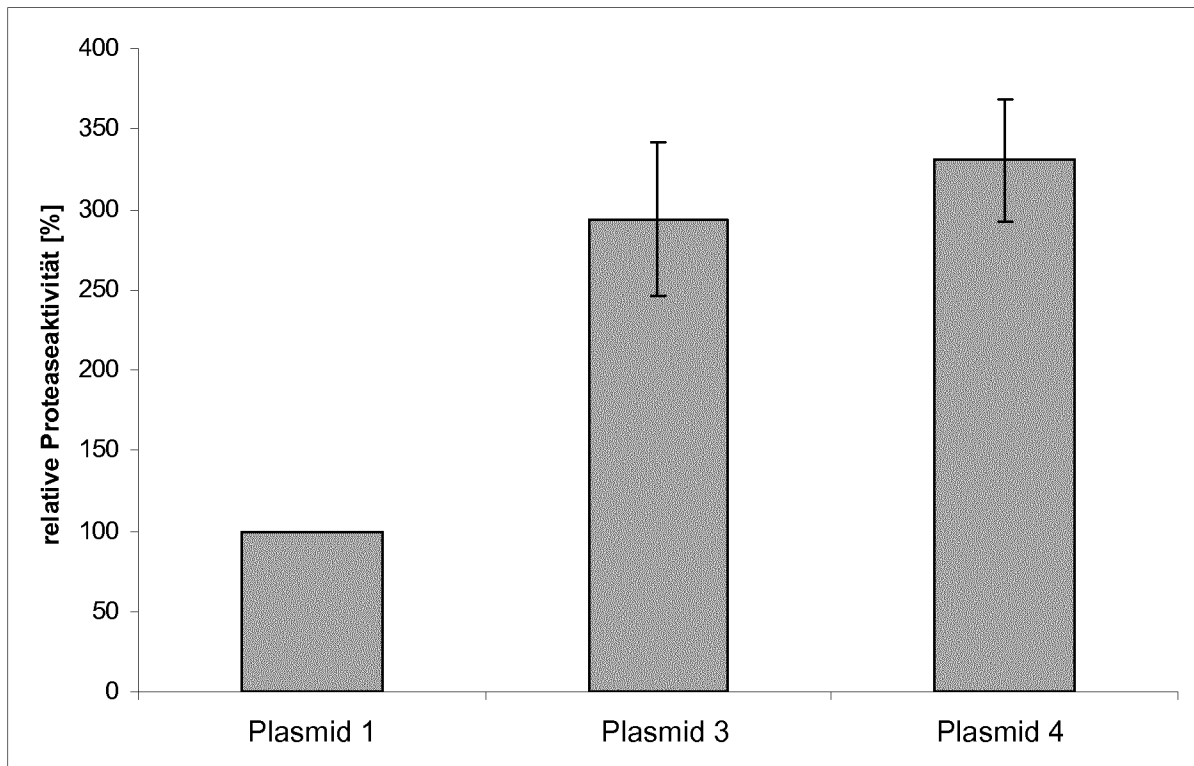
- (a) Threonin an Position 3 (3T),
- (b) Isoleucin an Position 4 (4I),
- (c) Alanin, Threonin oder Arginin an Position 61 (61A, 61T oder 61R),
- (d) Asparaginsäure oder Glutaminsäure an Position 154 (154D oder 154E),
- (e) Prolin an Position 188 (188P),
- (f) Methionin an Position 193 (193M),
- (g) Isoleucin an Position 199 (199I),
- (h) Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Glycin an Position 211 (211D, 211E oder 211G),
- (i) Kombinationen der Aminosäuren (a) bis (h).

7. Nicht menschliche Wirtszelle enthaltend einen Expressionsvektor gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Wirtszelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Bakterium ist, bevorzugt eines, das ausgewählt ist aus der Gruppe der Gattungen von Escherichia, Klebsiella, Bacillus, Staphylococcus, Corynebakterium, Arthrobacter, Streptomyces, Stenotrophomonas und Pseudomonas, weiter bevorzugt eines, das ausgewählt ist aus der Gruppe von Escherichia coli, Klebsiella planticola, Bacillus licheniformis, Bacillus lentus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis, Bacillus alcalophilus, Bacillus globigii, Bacillus gibsonii, Bacillus clausii, Bacillus halodurans, Bacillus pumilus, Staphylococcus carnosus, Corynebacterium glutamicum, Arthrobacter oxidans, Streptomyces lividans, Streptomyces coelicolor und Stenotrophomonas maltophilia, insbesondere Bacillus licheniformis.
9. Verfahren zur Herstellung eines Proteins umfassend die Verfahrensschritte
 - (a) Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8
 - (b) Isolieren des Proteins aus dem Kulturmedium oder aus der Wirtszelle.
10. Verwendung eines Expressionsvektors gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 oder einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8 zur Herstellung eines Proteins.

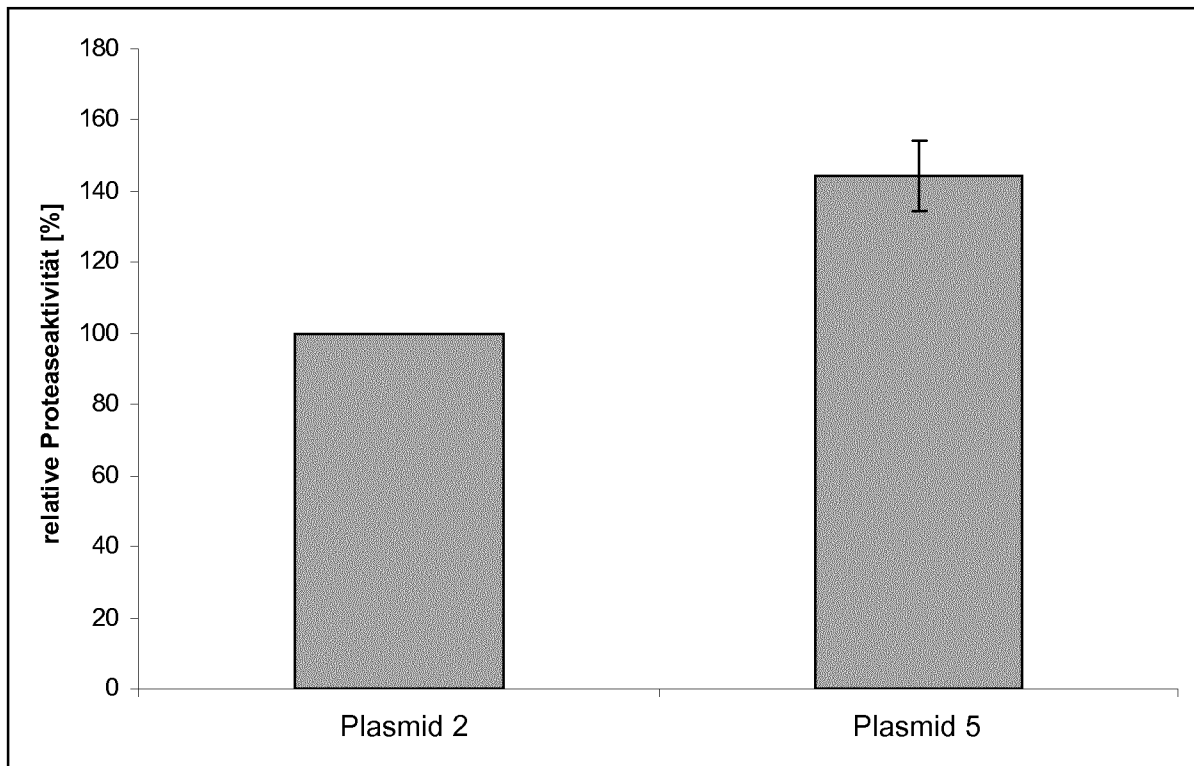
Figur 1:



Figur 2:



Figur 3:



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/059901

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/00 ADD.		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/015327 A1 (LECTA GMBH C [DE]; GREINER-STOEFFELE THOMAS [DE]; SCHOENERT STEFAN [DE] 10 February 2011 (2011-02-10) the whole document	1-10
Y	WO 92/21760 A1 (COGNIS INC [US]) 10 December 1992 (1992-12-10) page 84 - page 85; sequence 19	6
Y	WO 2007/122175 A1 (NOVOZYMES AS [DK]; MINNING STEFAN [AT]; KNOETZEL JUERGEN CARSTEN FRANZ) 1 November 2007 (2007-11-01) sequence 2	6
Y	DE 10 2007 049830 A1 (HENKEL AG & CO KGAA [DE]) 23 April 2009 (2009-04-23) sequence 1	6
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 July 2012		19/09/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Scheffzyk, Irmgard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/059901

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/054185 A1 (HENKEL KGAA [DE]; WEBER ANGRIT [DE]; HELLEBRANDT ANGELA [DE]; SCHMITZ) 3 July 2003 (2003-07-03) figure 1 -----	6

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:

1-10 (in part)**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

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

1. Claims 1-10 (in part)

Expression vector comprising a signal peptide that is at least 80% identical to SEQ ID NO. 2 or is structurally homologous thereto.

2. Claims 1-10 (in part)

Expression vector comprising a signal peptide that is at least 80% identical to SEQ ID NO. 4 or is structurally homologous thereto.

3. Claims 1-10 (in part)

Expression vector comprising a signal peptide that is at least 80% identical to SEQ ID NO. 6 or is structurally homologous thereto.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/059901

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2011015327	A1	10-02-2011	EP 2462224 A1	13-06-2012
			US 2012135498 A1	31-05-2012
			WO 2011015327 A1	10-02-2011

WO 9221760	A1	10-12-1992	AT 203771 T	15-08-2001
			DE 69231974 D1	06-09-2001
			DE 69231974 T2	04-04-2002
			DK 0590012 T3	12-11-2001
			EP 0590012 A1	06-04-1994
			ES 2164644 T3	01-03-2002
			GR 3037002 T3	31-01-2002
			JP 3444422 B2	08-09-2003
			JP H06508264 A	22-09-1994
			US 5340735 A	23-08-1994
			US 5500364 A	19-03-1996
			US 5985639 A	16-11-1999
			US 6136553 A	24-10-2000
			US 6403331 B1	11-06-2002
			WO 9221760 A1	10-12-1992

WO 2007122175	A1	01-11-2007	CN 101460618 A	17-06-2009
			EP 2013339 A1	14-01-2009
			JP 2009534022 A	24-09-2009
			US 2009215663 A1	27-08-2009
			WO 2007122175 A1	01-11-2007

DE 102007049830	A1	23-04-2009	CN 101821285 A	01-09-2010
			DE 102007049830 A1	23-04-2009
			EP 2197904 A1	23-06-2010
			JP 2011500042 A	06-01-2011
			US 2010196991 A1	05-08-2010
			WO 2009050022 A1	23-04-2009

WO 03054185	A1	03-07-2003	AU 2002361400 A1	09-07-2003
			CN 1606619 A	13-04-2005
			DE 10162727 A1	10-07-2003
			EP 1456367 A1	15-09-2004
			HU 0402539 A2	28-04-2005
			JP 2005534280 A	17-11-2005
			US 2005003504 A1	06-01-2005
			WO 03054185 A1	03-07-2003

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12N15/00 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTER 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, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2011/015327 A1 (LECTA GMBH C [DE]; GREINER-STOEFFELE THOMAS [DE]; SCHOENERT STEFAN [DE] 10. Februar 2011 (2011-02-10) das ganze Dokument -----	1-10
Y	WO 92/21760 A1 (COGNIS INC [US]) 10. Dezember 1992 (1992-12-10) Seite 84 - Seite 85; Sequenz 19 -----	6
Y	WO 2007/122175 A1 (NOVOZYMES AS [DK]; MINNING STEFAN [AT]; KNOETZEL JUERGEN CARSTEN FRANZ) 1. November 2007 (2007-11-01) Sequenz 2 -----	6
Y	DE 10 2007 049830 A1 (HENKEL AG & CO KGAA [DE]) 23. April 2009 (2009-04-23) Sequenz 1 -----	6
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> 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" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. 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 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	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
9. Juli 2012	19/09/2012	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Scheffzyk, Irmgard	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 03/054185 A1 (HENKEL KGAA [DE]; WEBER ANGRIT [DE]; HELLEBRANDT ANGELA [DE]; SCHMITZ) 3. Juli 2003 (2003-07-03) Abbildung 1 -----	6

Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 c) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde, ist die internationale Recherche auf der Grundlage eines Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- a. (Form)
- in Papierform
- in elektronischer Form
- b. (Zeitpunkt)
- in der eingereichten internationalen Anmeldung
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form
- bei dieser Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht wurde.
2. Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

Feld Nr. 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 internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese 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 Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese 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 zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren 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. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:
1-10 (teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- Die Zahlung der zusätzlichen 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: 1-10(teilweise)

Expressionsvektor enthaltend ein Signalpeptide, welches zu SEQ.ID.NO. 2 mindestens 80% identisch ist oder diesbezüglich strukturhomolog ist

2. Ansprüche: 1-10(teilweise)

Expressionsvektor enthaltend ein Signalpeptide, welches zu SEQ.ID.NO. 4 mindestens 80% identisch oder diesbezüglich strukturhomolog ist.

3. Ansprüche: 1-10(teilweise)

Expressionsvektor enthaltend ein Signalpeptide, welches zu SEQ.ID.NO. 6 mindestens 80% identisch oder diesbezüglich strukturhomolog ist.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/059901

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2011015327 A1	10-02-2011	EP 2462224 A1	13-06-2012
		US 2012135498 A1	31-05-2012
		WO 2011015327 A1	10-02-2011

WO 9221760 A1	10-12-1992	AT 203771 T	15-08-2001
		DE 69231974 D1	06-09-2001
		DE 69231974 T2	04-04-2002
		DK 0590012 T3	12-11-2001
		EP 0590012 A1	06-04-1994
		ES 2164644 T3	01-03-2002
		GR 3037002 T3	31-01-2002
		JP 3444422 B2	08-09-2003
		JP H06508264 A	22-09-1994
		US 5340735 A	23-08-1994
		US 5500364 A	19-03-1996
		US 5985639 A	16-11-1999
		US 6136553 A	24-10-2000
		US 6403331 B1	11-06-2002
WO 9221760 A1	10-12-1992		

WO 2007122175 A1	01-11-2007	CN 101460618 A	17-06-2009
		EP 2013339 A1	14-01-2009
		JP 2009534022 A	24-09-2009
		US 2009215663 A1	27-08-2009
		WO 2007122175 A1	01-11-2007

DE 102007049830 A1	23-04-2009	CN 101821285 A	01-09-2010
		DE 102007049830 A1	23-04-2009
		EP 2197904 A1	23-06-2010
		JP 2011500042 A	06-01-2011
		US 2010196991 A1	05-08-2010
		WO 2009050022 A1	23-04-2009

WO 03054185 A1	03-07-2003	AU 2002361400 A1	09-07-2003
		CN 1606619 A	13-04-2005
		DE 10162727 A1	10-07-2003
		EP 1456367 A1	15-09-2004
		HU 0402539 A2	28-04-2005
		JP 2005534280 A	17-11-2005
		US 2005003504 A1	06-01-2005
		WO 03054185 A1	03-07-2003
