

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 15/75, 15/57, 1/21 // (C12N 1/21, C12R 1/125, 1/10)	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/02802 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. März 1991 (07.03.91)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP90/01347 (22) Internationales Anmeldedatum: 16. August 1990 (16.08.90) (30) Prioritätsdaten: P 39 28 046.2 25. August 1989 (25.08.89) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN [DE/DE]; Henkelstraße 67, D-4000 Düsseldorf 13 (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : BERGER, Harald [DE/DE]; Alt Pempelfort 11 A, D-4000 Düsseldorf (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN; TFP-Patentabteilung, Henkelstrasse 67, D-4000 München 13 (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent)*, DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: HYBRID PLASMIDS FOR THE PRODUCTION OF SUBTILISIN CARLSBERG IN BACILLUS (54) Bezeichnung: HYBRIDPLASMIDE ZUR ERZEUGUNG VON SUBTILISIN CARLSBERG IN BACILLUS (57) Abstract The invention concerns hybrid plasmids for the production of protease in bacillus, consisting of a bacillus-common basic plasmid and a DNA sequence which codes for a protease of the subtilisin Carlsberg type. The aim of the invention is to increase the expressability. This is achieved by virtue of the fact that the DNA section between the <i>Ava</i> I and <i>Sst</i> I interfaces closest to the protease structural gene, which codes for subtilisin Carlsberg, is used as the protease sequence. (57) Zusammenfassung Bei Hybridplasmiden zur Erzeugung von Protease in bacillus, bestehend aus einem Bacillus-gängigen Grundplasmid und einer DNA-Sequenz, die für eine Protease vom Typ Subtilisin Carlsberg kodiert, sollte die Expressionsfähigkeit erhöht werden. Dies gelang dadurch, daß als Proteasesequenz das DNA-Stück zwischen den dem Proteasestrukturen am nächsten benachbarten Schnittstellen <i>Ava</i> I und <i>Sst</i> I, welches für Subtilisin Carlsberg kodiert, eingesetzt wird.		

BENENNUNGEN VON "DE"

Bis auf weiteres hat jede Benennung von "DE" in einer internationalen Anmeldung, deren internationaler Anmeldetag vor dem 3. Oktober 1990 liegt, Wirkung im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland mit Ausnahme des Gebietes der früheren DDR.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Fasso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
DE	Deutschland	LU	Luxemburg	TG	Togo
DK	Dänemark	MC	Monac	oUS	Vereinigte Staaten von Amerika

- 1 -

"Hybridplasmide zur Erzeugung von Subtilisin Carlsberg in Bacillus"

Die Erfindung betrifft neue Hybridplasmide, die es ermöglichen, die alkalische Protease Subtilisin Carlsberg und damit verwandte proteolytische Enzyme in erhöhten Mengen in Bacillus zu exprimieren.

Es sind zahlreiche Proteasen bekannt, die von Mikroorganismen, insbesondere Bakterien und Pilzen gebildet werden und durch aktiven Transport aus der Zelle ausgeschleust werden, so daß sie sich im Kulturmedium sammeln. Zahlreiche Enzyme dieser Art finden bereits technische Anwendung in Verfahren, bei denen es darum geht, Proteine abzubauen. Wichtige Anwendungen sind beispielsweise Wasch- und Reinigungsmittel oder auch Tiernahrungsmittel.

Aufgrund der technischen Bedeutung der Enzyme, die für die Protease Subtilisin Carlsberg etwas höher anzusetzen ist als für die Protease Subtilisin BPN', hat es in der Vergangenheit bereits zahlreiche Versuche gegeben, Stämme aufzufinden, die das eine oder andere Enzym produzieren und die sich zur technischen Gewinnung der Produkte eignen. Verwiesen sei beispielsweise auf die folgenden deutschen

...

Offenlegungs- oder Patentschriften: DE 19 40 488, DE 20 18 451, DE 20 44 161, DE 21 01 803, DE 21 21 397 und DE 29 25 427 sowie auf GB 1 263 765, US 3 623 957, US 4 264 738 und EP-A 6 638. Bei den genannten Anmeldungen bzw. Patenten handelt es sich um klassische Mutationsverfahren, bei denen durch die häufige Wiederholung von Mutations- und Selektionsschritten letztendlich Produktionsstämme gewonnen werden, die im Hinblick auf Ausbeute oder Produktqualität optimiert sind. Es ist dem Fachmann bekannt, daß ein derartiger Mutationsprozeß statistisch abläuft, so daß kaum zu erwarten ist, daß dabei maßgeschneiderte Stämme entstehen, die das objektiv höchstmögliche Leistungsniveau aufweisen. Darüber hinaus können derartige Zuchtstämme auch zu Rückmutationen neigen, d.h. sie verlieren ihre günstigen Eigenschaften, zumindest teilweise und verwildern.

In der deutschen Offenlegungsschrift DE 35 27 913 werden Hybridplasmide für Mikroorganismen der Gattung *Bacillus* beschrieben, die eine doppelsträngige DNA enthalten, die den folgenden Aufbau aufweist: Promotor, der von der RNA-Polymerase von Mikroorganismen der Gattung *Bacillus* erkannt wird, Ribosomenbindungsstelle, Startcodon, Strukturgen, das für Subtilisin Carlsberg oder dessen Teilstücke mit proteolytischer Aktivität oder Varianten mit proteolytischer Aktivität einschließlich deren Leader-Sequenzen codiert, Stopcodon. Ein derartiges Konstrukt, bei dem die eingefügte DNA-Sequenz aus *Bacillus licheniformis* stammt und für Subtilisin Carlsberg kodiert und der restliche Plasmidteil von pBC16 stammt, wird Plasmid pC50 genannt.

In der deutschen Patentanmeldung P 38 21 491 wird beschrieben, daß Plasmide, die eine noch höhere Protease-Expression bewirken, dadurch erhalten werden können, daß man das DNA-Stück, das in pC50 zwischen zwei relativ benachbarten *Ava*I-Schnittstellen steht, und einen Teil

...

des Promotors beinhaltet, durch Schneiden mit *Ava*I und Ligieren entfernt.

Vor dem Hintergrund dieses Standes der Technik ist es Aufgabe der Erfindung Plasmide zu liefern, die eine noch höhere Protease-Expression bewirken.

Gegenstand der Erfindung sind daher Hybridplasmide zur Erzeugung von Protease in *Bacillus*, bestehend aus einem *Bacillus*-gängigen Grundplasmid und einer DNA-Sequenz, die für eine Protease vom Typ Subtilisin Carlsberg kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß als Protease-Sequenz eine DNA Sequenz eingefügt ist, die für eine Protease vom Typ Subtilisin Carlsberg kodiert und up-stream durch die dem Strukturgen am nächsten benachbarte *Ava*I-Schnittstelle, down-stream durch die am nächsten benachbarte *Sst*I-Schnittstelle begrenzt ist.

Bevorzugt ist jedenfalls das Schnittstück zwischen der *Sst*I-Schnittstelle und der dieser Schnittstelle am nächsten benachbarten *Ava*I-Schnittstelle in einem Ausgangsplasmid wie pC50. Besonders bevorzugtes Ausgangsmaterial ist ein Plasmid pC50 gemäß DE 35 27 913. Hier gilt, daß wenn die in Beziehung zur Leserichtung vor dem Proteasegen und ihm am nächsten liegende *Ava*I-Schnittstelle am Basenpaar 1 schneidet, so schneidet die Restriktionsendonuclease *Sst*I am Basenpaar 1539 hinter dem Proteasegen bzw. hinter seinem Transcriptions-Terminator.

Zur Erzeugung der erfindungsgemäßen Plasmide wird von Plasmiden ausgegangen, die das Strukturgen von Subtilisin Carlsberg oder einem Subtilisin Carlsberg ähnlichen Enzym enthalten.

Unter einem Subtilisin Carlsberg ähnlichen Enzym werden hier solche Enzyme verstanden, die in bis zu 1 % der Aminosäuren von Subtilisin Carlsberg abweichen und ebenfalls Proteaseaktivität im vergleichba-

...

ren Umfang aufweisen, wobei die Strukturgene die genannten Schnittstellen aufweisen müssen.

Bevorzugtes Ausgangsmaterial ist ein Plasmid pC50, hergestellt aus einem pBC16-Anteil und dem Strukturgen von Subtilisin Carlsberg aus *Bacillus licheniformis* DSM641 oder aus *Bacillus licheniformis* DSM 5440. Das entsprechende Ausgangsplasmid trägt die Bezeichnung pC50.

Um mehrere zusätzliche Restriktionsenzym-Spaltstellen für Umklo-
nierungen zur Verfügung zu haben, wurde das Subtilisin Carlsberg-
Proteasegen umfassende *Ava*I/*Sst*I-Fragment aus pC50 (Figur 1) in die
Multiple Cloning site des *E. coli* Vektors pUC19 (1) kloniert.

Hierfür wurde pC50 mit *Ava*I und *Sst*I und pUC19 (Figur 2) mit *Xma*I
und *Sst*I gespalten. Um die Klonierung des Vektorteils aus pC50 in
pUC19 zu verhindern, wird pC50 zusätzlich mit *Pvu*II gespalten, das
das den Proteaseanteil tragende *Ava*I/*Sst*I-Fragment intakt läßt,
aber den pBC16-Vektorteil 2mal schneidet. Nach der Inkubation wurden
die Enzyme 2mal mit der halben Volumen Phenol, bezogen auf DNA-Lö-
sung, extrahiert, dann im mengenmäßigen Verhältnis von 1 : 1 ge-
mischt, das Gemisch 5mal mit gleichem Volumen Ether extrahiert und
sodan mit doppeltem Volumen Ethanol 20 Minuten bei -20°C inkubiert
und die DNA durch Zentrifugation pelletiert. Nach Trocknen wurde die
DNA in geeignetem Puffer gelöst. Die DNA-Konzentration wurde auf
20 µg/ml eingestellt und T4-DNA-Ligase in einer Konzentration von
1 U/µg eingesetzter DNA zugegeben. Die Ligasereaktion wurde ca. 18 h
bei 6°C durchgeführt.

1 µg der mittels T4-DNA-Ligase verknüpften DNA-Fragmente wurden dann
zur Transformation kompetenter Zellen (2) von *Escherichia coli* JM103
(3) benutzt. Selektioniert wurde auf LB-Medium (Luria-Broth) mit 1%
Agar mit 100 µg/ml Ampicillin.

...

In Schnell-Lysaten wurde durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym PstI, das sowohl im Insert als auch im pUC19-Vektorteil im Multiple Cloning-Bereich spaltet, anhand des korrekten Spaltmusters der richtige Klon ausgewählt und als pH9 (Figur 3) bezeichnet.

Die DNA wurde nach der SDS-NaCl-Methode von Guerry et al. (4), mit nachfolgender Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen.

Als Vektoren für die Klonierung des AvaI/SstI-Proteasegenfragments wurden die Bacillusvektoren pUB110 (5; Figur 4) und pBC16 (6; Figur 5) verwendet. Diese beiden Plasmide sind weitgehend homolog und unterscheiden sich im wesentlichen nur in der Resistenz-Determinante (Kanamycin für pUB110 und Tetracyclin für pBC16). Zum Zwecke der Klonierung wurden sowohl pH9 als auch pUB110 und pBC16 mit BamHI und EcoRI gespalten, wobei bei letzterem die EcoRI-Spaltung nur unvollständig erfolgen darf, da zwei EcoRI-Spaltstellen in pBC16 vorhanden sind, von denen die Spaltstelle in Pos. 1 wie die entsprechende EcoRI-Spaltstelle in pUB110 für die Insertion des EcoRI/BamHI-P300-Protease-Fragments genutzt werden soll. BamHI- und EcoRI-Spaltstellen in pH9 stammen aus der Multiple Cloning site von pUC19. Auch im Falle des pH9 muß die EcoRI-Spaltung unvollständig vorgenommen werden, da eine zusätzliche EcoRI-Spaltstelle im Proteasegen existiert.

Für die Ligation wurde pH9 zu pUB110 bzw. pBC16 im mengenmäßigen Verhältnis 2 : 1 eingesetzt. Die Gesamt-DNA-Konzentration betrug 200 µg/ml.

Die Transformation erfolgte in beiden Fällen in *Bacillus subtilis* SB202 (7).

Die Transformanten wurden auf Vollmediumagarplatten mit 15 µg/ml Tetracyclin für die Ligation mit pBC16 als Vektor, und 10 µg/ml

...

Kanamycin für die Ligation mit pUB110 als Vektor, selektioniert. Für die Selektionierung Protease-produzierender Klone wurde eine immunologische Methode eingesetzt, die auf einem Verfahren von Broome und Gilbert basiert (8, 9). Diese Methode wurde bereits bei der ursprünglichen Klonierung des Subtilisin Carlsberg Proteasogens in der Offenlegungsschrift DE 35 27 913 A1 angewandt.

Immunologisch positive Klone wurden mittels Restriktionsanalyse von Schnell-Lysaten identifiziert und der pBC16-Abkömmling als pC51 (Figur 6) sowie das pUB110-Derivat als pH70 (Figur 7) bezeichnet.

Beispiele

Beispiel 1: Expression von Subtilisin Carlsberg Protease in *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis SB202 pC51 und *Bacillus subtilis* SB202 pH70 wurden bei 37°C vergleichend zu *Bacillus subtilis* SB202 in Schüttelkolben in einem für Proteaseproduktion geeigneten Komplexmedium (9,1 g/l KH_2PO_4 , 11,8 g/l K_2HPO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g/l Sojamehl, 18 g/l Casein nach Hammarsten, 180 g/l Amylase-behandelte Kartoffelstärke) angezogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung der Proteaseaktivität genommen. Die Proteaseaktivität wurde mittels Cenco-Autoanalysator (Firma Skalar) gemessen. Dabei wird die enzymhaltige Lösung mit dem Substrat Dimethylcasein inkubiert. Es entstehen durch Proteolyse primäre Aminogruppen, die unter Bildung eines stabilen gelben Komplexes mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure reagieren. Die Farbmessung erfolgt im kontinuierlichen Durchfluß bei 420 nm.

Stamm	relative Proteaseaktivität
-------	----------------------------

<i>Bacillus subtilis</i> SB202	1
<i>Bacillus subtilis</i> SB202pC51	ca. 2
<i>Bacillus subtilis</i> SB202pH70 (DSM 5479)	60-80

Beispiel 2: Transformation von *Bacillus licheniformis* DSM 5440

Von den Stämmen *Bacillus subtilis* SB202pC51 und *Bacillus subtilis* SB202pH70 (DSM 5479) wurde Plasmid-DNA aufgearbeitet (10) und Protoplasten von *Bacillus licheniformis* DSM5440 hiermit trans-

...

formiert. Die Transformanten wurden auf DM3-Agar (11) mit 15 µg/ml Tetracyclin für die Selektionierung von pC51 und auf Mannitol-Agar (12) mit 10 µg/ml Neomycin für die Selektionierung von pH 70 selektioniert.

Gewachsene Kolonien wurden auf Calcium-Caseinat-Agar (Merck) mit 15 µg/ml Tetracyclin (pC51) bzw. 10 µg/ml Kanamycin (pH70) überimpft. Transformanten, die nach Wachstum einen gegenüber E312 größeren Lysehof auf diesen Platten aufwiesen, wurden nach Restriktionszymanalyse von Schnell-Lysaten auf ihre Übereinstimmung mit den für die Transformation verwendeten Plasmid-DNAs überprüft.

Beispiel 3: Expression von pC51/pH70 in *Bacillus licheniformis* DSM 5440

Bacillus licheniformis DSM5440, der die Plasmide pC50, pC51 oder pH70 enthält, wurde in Schüttelkolben in einem für Proteaseproduktion geeigneten Komplexmedium (2,4 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g/l Sojamehl, 12 g/l Casein nach Hammarsten, 120 g/l Amylase-behandelte Kartoffelstärke) bei 39°C und 34°C angezogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung der Proteaseaktivität genommen. Die Proteasemessungen wurden mit N-CBZ-valin-p-nitrophenylester als Substrat durchgeführt, wobei das Substrat in N-CBZ-Aminosäure und p-Nitrophenol gespalten wird. Die Bildung des p-Nitrophenols wurde als Maß für die Aktivität der Protease bei 340 nm im Photometer gemessen (13).

Stamm	Relative Proteaseaktivität (%) *	
	39°C	34°C

DSM 5440 mit pC50	80 - 100 %	120 - 130 %
DSM 5440 mit pC51	130 %	160 %
Hinterlegungsnummer DSM 5478		
DSM 5440 mit pH70	100 - 120 %	135 %

* Die Angaben beziehen sich auf DSM 5440 bei 39°C.

Bei 34°C kommt es unter den angegebenen Bedingungen offensichtlich zu einer besseren Proteaseausbeute mit den rekombinanten Plasmiden pC50, pC51 und pH70; was vermutlich auf die bessere Sauerstoffversorgung der Stämme bei gleichzeitig langsamerem Wachstum und höherer Stabilität der Plasmide zurückzuführen ist.

Methoden

Wenn im Text nicht andere Angaben gemacht wurden, wurde insbesondere für folgende Methoden das Handbuch von Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1982) zugrundegelegt:

- * Phenolisierung von DNA
- * Ethanolfällung von DNA
- * Ligation von DNA

...

Literatur

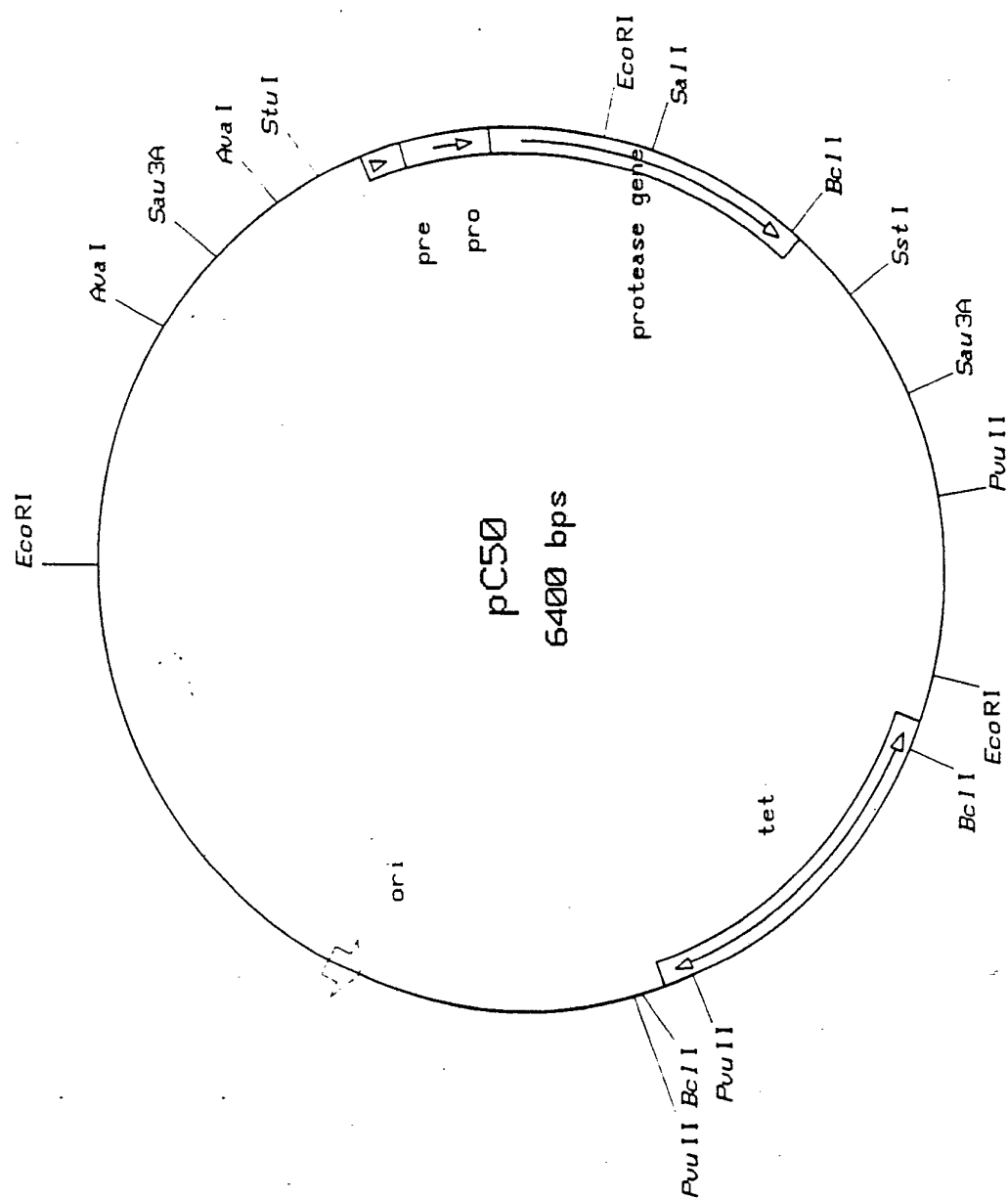
1. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J., Gene 33: 103 (1985)
Kommerziell erhältlich durch z.B. Biolabs New England
2. Mandel, M. & Higa, A., J. Mol. Biol. 53: 154 (1970)
3. Messing, J., Crea, J.R. & Séeburg, P.H., Nucleic Acids Res. 9: 309 (1981)
4. Guerry, P., LeBlanc, D.J. & Falkow, S., J. Bacteriol. 116: 1064 (1973)
5. Bacillus Genetic Stock Center Nr. 1E6
6. Bacillus Genetic Stock Center Nr. 1E9 / DSM 402
7. Copeland, J.C. Marmur, J. Bacteriol. Rev. 32 : 302 - 312 (1968)
8. Broome, S. & Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A. 75: 2746 (1978)
9. Buckel, P. & Zehelein, E., Gene 16: 149 (1981)
10. Godson, G.N. & Vapnek, D., Biochim. Biophys. Acta 299: 516 (1973)
11. Chang, S. & Cohen, S.N., Molec. Gen. Genet. 168: 111 (1979)
12. Bourne, N., Dancer, B.N., J. Gen. Microbio. 132: 251 (1986)
13. Dupaix, A., Bechet, J.-J. & Roncons, C., Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 464 (1979)

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Hybridplasmide zur Erzeugung von Protease in Bacillus, bestehend aus einem Bacillus-gängigen Grundplasmid und einer DNA-Sequenz, die für eine Protease vom Typ Subtilisin Carlsberg kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß als Protease-Sequenz eine DNA Sequenz eingefügt ist, die für eine Protease vom Typ Subtilisin Carlsberg kodiert und up-stream durch die dem Strukturgen am nächsten benachbarte AvaI-Schnittstelle, down-stream durch die am nächsten benachbarte SstI-Schnittstelle begrenzt ist.
2. Hybridplasmid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Grundplasmid das Bacillus-Plasmid pBC 16 enthalten ist (Plasmid pC51).
3. Hybridplasmid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Grundplasmid das Bacillus-Plasmid pUB110 enthalten ist (Plasmid pH70).
4. Transformierte Stämme der Gattung Bacillus subtilis und/oder licheniformis enthalten Plasmide nach den Ansprüchen 1 bis 3.
5. Transformierte Stämme Bacillus subtilis SB202 pH 70 (DSM 5479) und Bacillus licheniformis pC 51 (DSM 5478).

...

1/7

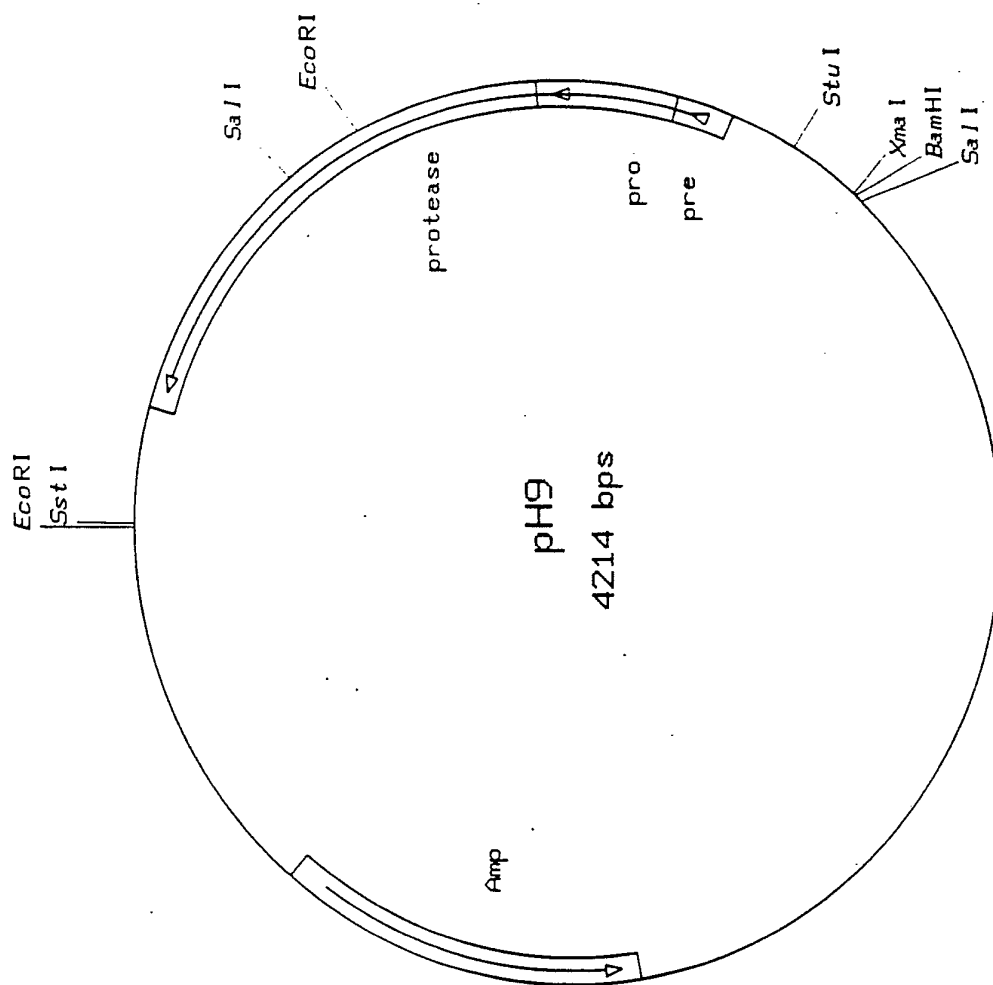


2/7



Figur 3

3/7

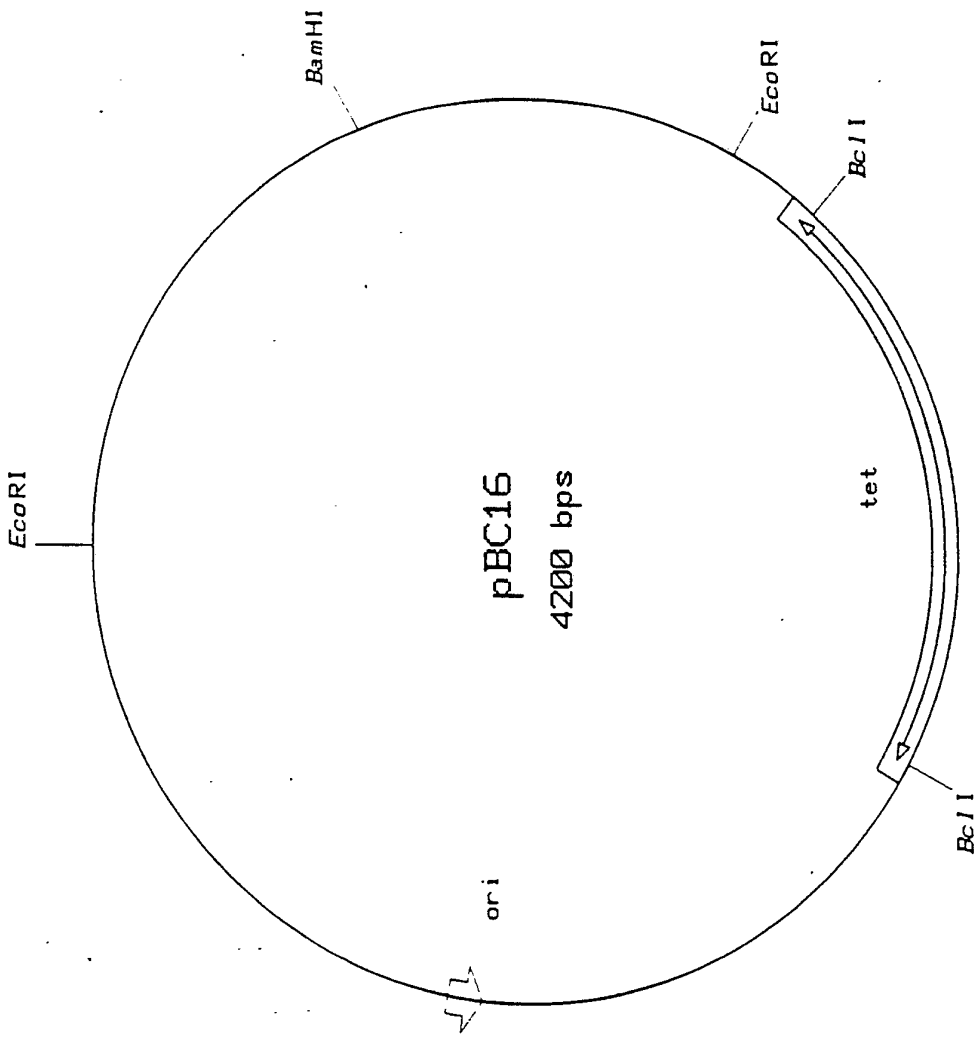


4/7

Figur 4

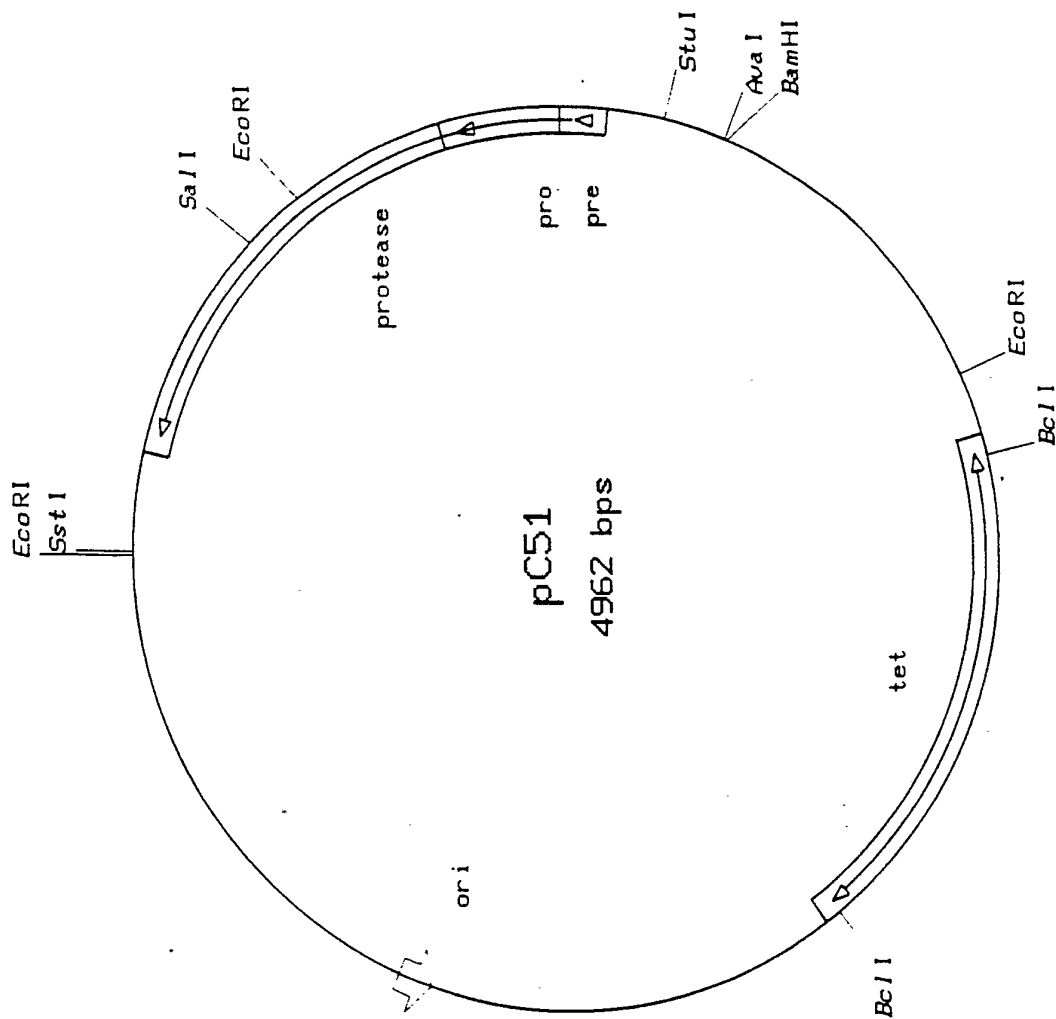


Figur 5



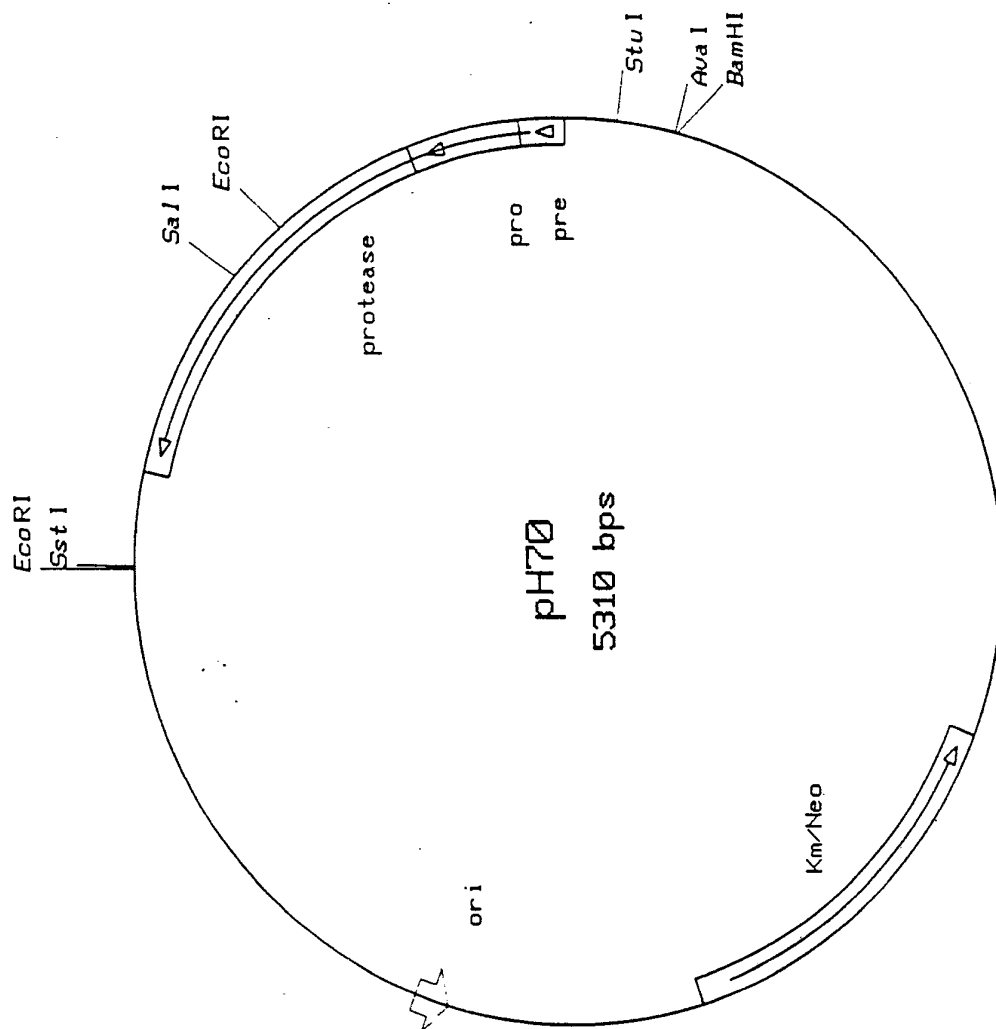
Figur 6

6/7



Figur 7

7/7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 90/01347

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC IPC⁵: C 12 N 15/75, C 12 N 15/57, C 12 N 1/21, (C 12 N 1/21, C 12 R 1:125, C 12 R 1:10)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
IPC ⁵	C 12 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages **	Relevant to Claim No. ¹³
A	EP, A, 0214435 (HENKEL KGaA) 18 March 1987 see the whole document (cited in the application)	
--		
A	Nucleic Acids Research, vol. 13, N°. 24, December 1985, IRL Press Limited, (Oxford, GB), M. Jacobs et al.: "Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from Bacillus licheniformis", pages 8913-8926, see pages 8916, line 12 - page 8918, line 23	
--		
./.		
* Special categories of cited documents: ¹⁰ "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 "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		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
19 November 1990 (19.11.90)		19 December 1990 (19.12.90)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
P,Y	EP, A, 0348814 (HENKEL KGaA) 3 January 1990 see the whole document --	1-5
P,Y	EP, A, 0351717 (HENKEL KGaA) 24 January 1990 see page 3, column 4, lines 15-34 -----	1-5

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9001347
SA 39562

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 11/12/90
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0214435	18-03-87	DE-A- 3527913	12-02-87
		AU-A- 6078986	05-02-87
		JP-A- 62032888	12-02-87

EP-A- 0348814	03-01-90	DE-A- 3821491	28-12-89
		JP-A- 2057186	26-02-90

EP-A- 0351717	24-01-90	DE-A- 3824827	01-02-90
		JP-A- 2076587	15-03-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 90/01347

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Cl. ⁵ C 12 N 15/75, C 12 N 15/57, C 12 N 1/21, (C 12 N 1/21, C 12 R 1:125, C 12 R 1:10)		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl. ⁵	C 12 N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. 13
A	EP, A, 0214435 (HENKEL KGaA) 18. März 1987 siehe das ganze Dokument (in der Anmeldung erwähnt) --	
A	Nucleic Acids Research, Band 13, Nr. 24, Dezember 1985, IRL Press Limited, (Oxford, GB), M. Jacobs et al.: "Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from Bacillus licheniformis", Seiten 8913-8926, siehe Seite 8916, Zeile 12 - Seite 8918, Zeile 23 -- ./.	
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰: "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 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		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 19. November 1990		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 19. 12. 90
Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten F.W. HECK

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,Y	EP, A, 0348814 (HENKEL KGaA) 3. Januar 1990 siehe das ganze Dokument --	1-5
P,Y	EP, A, 0351717 (HENKEL KGaA) 24. Januar 1990 siehe Seite 3, Spalte 4, Zeilen 15-34 -----	1-5

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9001347

SA 39562

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 11/12/90

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0214435	18-03-87	DE-A- 3527913	12-02-87
		AU-A- 6078986	05-02-87
		JP-A- 62032888	12-02-87
EP-A- 0348814	03-01-90	DE-A- 3821491	28-12-89
		JP-A- 2057186	26-02-90
EP-A- 0351717	24-01-90	DE-A- 3824827	01-02-90
		JP-A- 2076587	15-03-90

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82