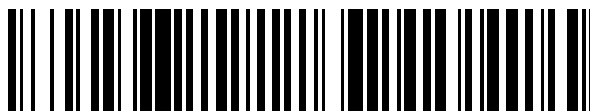


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 763**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2013** **PCT/EP2013/064271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014** **WO14009276**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2013** **E 13734747 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018** **EP 2870173**

54 Título: **Proteasa neutra producida de forma recombinante procedente de Paenibacillus polymyxa**

30 Prioridad:

09.07.2012 EP 12175563

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.02.2019

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacher Strasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

GREINER-STOEFFELE, THOMAS y
SCHOENERT, STEFAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 701 763 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteasa neutra producida de forma recombinante procedente de *Paenibacillus polymyxa*.

La presente divulgación proporciona la secuencia de una preproenzima de *Paenibacillus polymyxa* que es la precursora de una proteasa neutra, la expresión de la misma en un organismo huésped transformado y procedimientos para la producción de la proteasa neutra, mediante medios recombinantes. Además, se divulga el uso de la proteasa neutra producida de forma recombinante en el campo de la biología celular, particularmente con el propósito de realizar una disociación de tejido. La divulgación también incluye combinaciones con otras proteasas. Además, se divulgan secuencias de nucleótidos que codifican la proteasa neutra, así como fragmentos de las mismas.

La presente invención se refiere a los medios para proporcionar una proteasa neutra expresada de forma recombinante y activa enzimáticamente de *Paenibacillus polymyxa*, también conocida como Dispase®. Particularmente, se proporciona una secuencia de aminoácidos que es adecuada para la producción a gran escala por medio de la expresión recombinante de la misma, específicamente y con una ventaja particular en especies de *Bacillus* transformadas que sirven como una cepa huésped recombinante. En un modo de realización específico, la proteasa neutra de *Paenibacillus polymyxa* expresada de forma recombinante se segrega en el medio de cultivo líquido y se purifica a partir del mismo.

Antecedentes

El documento US 2006/269527 A1 informa de una proteasa neutra liofilizada de *Bacillus polymyxa*. El documento WO 2009/140343 A1 también divulga una proteasa neutra liofilizada. El documento EP2161333 A1 informa de la estabilización de termolisina en solución acuosa. El documento WO 1998/24889 A1 informa de una composición enzimática para la disociación de tejido, comprendiendo la composición dos enzimas colagenasa y una endoproteasa. El documento US 3930954 A, también citado más adelante, divulga la expresión y purificación de una proteasa neutra de *B. polymyxa*. Stenn, K.S., *et al.*, J. Invest. Dermatol. 93 (1989) 287-290, también citado más adelante, describe la dispa de *B. polymyxa*. Ikram-UI-Haq *et al.* Pakistan Congress of Zoology. Proceedings, Zool. Soc. Of Pakistan (PK) 24 (2004) 67-75 se refiere a estudios sobre la optimización de la producción de proteasa mediante *Bacillus subtilis* IH-16. Mansfield J. *et al.* Protein Expression and Purification 39 (2005) 219-228 describe la clonación y expresión de una proteasa neutra de *B. stearothermophilus* en *E. coli*. Wang Lin-Fa *et al.* J Gen Microbiol 139 (1993) 343-347 describe la expresión de la proteasa neutra nprE de *B. subtilis* en *S. cerevisiae*. Honjo M. *et al.* J Biotechnol 1 (1984) 265-277 describe la clonación y expresión del gen para la proteasa neutra de *B. amyloliquefaciens* en *B. subtilis*. Matta Hittu *et al.* Int J Food Microbiol 42 (1998) 139-145 describe el aislamiento de una proteasa extracelular termoestable de la cepa B-17 de *B. polymyxa*, proteasa que se califica como una metaloendopeptidasa neutra. Takekawa, S., *et al.*, J. Bacteriology 173 (1991) 6820-6825, también citado más adelante, informa de la clonación y expresión de una proteasa neutra de *B. polymyxa*. Twentyman P.R. *et al.* Cancer Lett 9 (1980) 225-228 informa sobre el uso de proteasas neutras de tipo IX de *B. polymyxa* para la disociación de tejido tumoral y la obtención de células a partir del mismo. Ruf A. *et al.* Acta Crystallographica Section D 69 (2013) 24-31 informa de la estructura de una metaloproteasa extracelular bacteriana similar a termolisina, haciendo referencia a la base de datos Uniprot con n.º de acceso E3E6L0 de 1 de mayo de 2013.

A partir de filtrados o sobrenadantes de cultivos de *Paenibacillus polymyxa* (*P. polymyxa*; también conocida anteriormente como *Bacillus polymyxa* o *B. polymyxa*, todos estos nombres taxonómicos se usan indistintamente en el presente documento), se aisló y caracterizó una proteasa neutra. En la literatura más reciente, la proteasa neutra a menudo se denomina "Dispase®", que es una marca registrada de Godo Shusei Co., Ltd., Tokio, Japón. Debido a la fibronectinasa y la actividad proteolítica de la colagenasa de tipo IV, se conoce la utilidad técnica de Dispase® particularmente en el campo de las células animales o el cultivo de tejidos. Por tanto, la disociación de un tejido (incluyendo los aglutinamientos de células o los agregados de células) en capas de células o incluso suspensiones de células sueltas se realiza con frecuencia con la actividad de esta enzima, solo con Dispase® o bien con Dispase® como un componente de combinaciones, es decir, combinada con otras enzimas proteolíticas, específicamente colagenasas, por ejemplo, como se divulga en el documento US 5.830.741.

El documento US 3.930.954 divulga una proteasa neutra de una cepa de *B. polymyxa* que tiene el número de acceso ATCC 21993 (en el documento también denominada FERM-P n.º 412). El documento describe, particularmente, el cultivo de la cepa bacteriana en condiciones aeróbicas en un medio líquido complejo (caldo de cultivo) que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas. La actividad proteolítica presente en el caldo de cultivo se supervisó durante el cultivo, indicando la cantidad de proteasa neutra segregada por las células en el sobrenadante líquido. Cuando se alcanzó la actividad máxima, se obtuvo el cultivo y los componentes particulados, incluyendo las células bacterianas, se separaron del sobrenadante mediante filtración en gel, seguido de concentración del filtrado a presión reducida. Tras una etapa de fraccionamiento no especificada adicionalmente con isopropanol, se obtuvo una preparación que representaba un 70 % de la actividad proteolítica total detectada en el caldo de cultivo. Otros procedimientos de enriquecimiento de proteasa enseñados en el documento US 3.930.954 incluyen la precipitación por adición de sal con sulfato de amonio y la precipitación con metanol, etanol y acetona, cada uno dando como resultado una preparación en bruto. Posteriormente, se aplicaron otras etapas de purificación, que finalmente dieron lugar a una preparación purificada. Por medio de análisis por ultracentrifugación, se determinó un

peso molecular de 35.900 dalton (Da) y se examinaron una serie de otros parámetros bioquímicos y biofísicos. Sin embargo, no se aportaron datos inequívocos que aclararan si la preparación divulgada contenía una proteasa única purificada homogéneamente o una mezcla de proteínas diferentes.

Stenn, K.S., *et al.*, J. Invest. Dermatol. 93 (1989) 287-290 divulgan un análisis de la especificidad del sustrato de una proteasa neutra (= Dispase®). Además, se presenta otra caracterización bioquímica de la proteasa neutra, usando material purificado derivado del filtrado de cultivo de *B. polymyxa*, y haciendo referencia al documento US 3.930.954. Notablemente, en el documento se muestra un gel de SDS PAGE que representa una muestra de 600 µg de proteína de una preparación de Dispase® disponible comercialmente. El gel teñido con azul de Coomassie presenta una banda principal delgada que migra a 41 kDa, aunque también al menos dos bandas débiles que migran entre 30 y 20 kDa, y otra banda débil que migra entre 20 y 14,4 kDa.

Usando la cepa 72 de *B. polymyxa* de Murao, S., *et al.* (Agric. Biol. Chem. 47 (1979) 941-947), los autores de Takekawa, S., *et al.*, J. Bacteriology 173 (1991) 6820-6825 describen la clonación en *E. coli* de un ADN de *B. polymyxa* genómico (SEQ ID NO: 1) que comprende una secuencia de nucleótidos con un marco abierto de lectura que codifica aparentemente la preproenzima con 590 aminoácidos (SEQ ID NO: 2; producto de traducción primario, molécula precursora antes de la secreción) de una proteasa neutra. Basándose en la composición de aminoácidos, se calculó que el peso molecular de la proteína segregada madura (procesada) conceptual que comprendía 304 aminoácidos era de 32.477 Da. Se descubrió que la proteasa neutra expresada en *E. coli* de un fragmento de *B. polymyxa* genómico y analizada a partir del sobrenadante de células de *E. coli* transformadas y alteradas migraba a aproximadamente 35 kDa en geles de SDS PAGE.

Para la comparación, Takekawa, S., *et al.* (*supra*) también purificaron una proteasa neutra extracelular de *B. polymyxa* del líquido de cultivo. Se determinó la secuencia de aminoácidos del extremo N de la proteasa neutra purificada. Notablemente, los primeros tres residuos de aminoácido en la secuencia del extremo N de Ala Thr Gly Thr Gly Lys Gly Val Leu Gly Asp Xaa Lys Ser Phe (SEQ ID NO:4) difieren de la secuencia de aminoácidos predicha comprendida en la SEQ ID NO: 2 en las posiciones 287-301 que se descubrió que era Asn Glu Ala Thr Gly Lys Gly Val Leu Gly Asp Ser Lys Ser Phe. El motivo de esta discrepancia seguía siendo incierto y no se aclaró adicionalmente.

Los autores de la presente divulgación pretendían producir una cepa huésped microbiana transformada que expresara de forma recombinante una proteasa neutra de *Paenibacillus polymyxa*. De forma inesperada, lo que sucedió es que las secuencias divulgadas por Takekawa, S., *et al.* (*supra*) no eran adecuadas para construir una cepa de expresión adecuada. Incluso resultó más sorprendente que el ADN aislado de la ATCC 21993 de *B. polymyxa* codificara una secuencia de aminoácidos de un producto de traducción primario para una proteasa neutra que no solo comprendía 592 aminoácidos, sino que también mostraba alteraciones en varias posiciones en el polipéptido codificado, en comparación con las secuencias publicadas previamente. Otro efecto sorprendente fue que *Bacillus amyloliquefaciens* es un organismo huésped particularmente adecuado para la producción recombinante de la proteasa neutra procedente de *Paenibacillus polymyxa*.

Sumario

La presente invención proporciona un procedimiento para producir de forma recombinante una proteasa neutra, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) proporcionar en un vector de expresión un ADN con una secuencia que codifica una preproenzima de acuerdo con la SEQ ID NO: 5, y transformar un organismo huésped de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* con el vector de expresión, obteniendo de este modo un organismo huésped transformado; seguido de (b) expresar el ADN en el organismo huésped transformado, en el que el organismo huésped transformado segrega la proteasa neutra; seguido de (c) aislar la proteasa neutra segregada; produciendo de forma recombinante de este modo la proteasa neutra.

La invención proporciona además una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la posición 289 a la posición 592 de la SEQ ID NO: 5, seleccionándose la secuencia de nucleótidos del grupo que consiste en (a) una secuencia de nucleótidos que tiene la secuencia de la posición 898 a la posición 1811 de la SEQ ID NO: 6; (b) secuencias de nucleótidos derivadas de la secuencia de nucleótidos de la posición 898 a la posición 1811 de la SEQ ID NO: 6 como resultado del código redundante. La invención proporciona además un vector que contiene una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención. La invención proporciona además un organismo huésped transformado de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* que contiene al menos un vector de acuerdo con la invención.

Un primer aspecto de todos los modos de realización como se divulga en el presente documento es un procedimiento para producir de forma recombinante una proteasa neutra, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) proporcionar en un vector de expresión un ADN con una secuencia que codifica una preproenzima de acuerdo con la SEQ ID NO: 5, y transformar un organismo huésped con el vector de expresión, obteniendo de este modo un organismo huésped transformado, en el que el organismo huésped es una especie procariota grampositiva; seguido de (b) expresar el ADN en el organismo huésped transformado, en el que el organismo huésped transformado segrega la proteasa neutra; seguido de (c) aislar la proteasa neutra segregada; produciendo de forma recombinante de este modo la proteasa neutra.

Un segundo aspecto de todos los modos de realización como se divulga en el presente documento es una proteasa neutra obtenida realizando un procedimiento para producir de forma recombinante una proteasa neutra como se divulga en el presente documento.

Un tercer aspecto de todos los modos de realización como se divulga en el presente documento es un procedimiento de aislamiento de células vivas de un tejido animal *in vitro*, que comprende las etapas de (a) proporcionar una proteasa neutra producida de forma recombinante obtenida realizando un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y (b) incubar el tejido *in vitro* con la proteasa neutra de la etapa (a), en el que los componentes proteínicos de la matriz extracelular del tejido se degradan proteolíticamente, y en el que se obtiene una capa de células o una suspensión de células vivas individuales, aislando de este modo las células vivas de un tejido animal *in vitro*.

Un cuarto aspecto de todos los modos de realización como se divulga en el presente documento es el uso de una proteasa neutra obtenida realizando un procedimiento para producir de forma recombinante una proteasa neutra como se divulga en el presente documento, siendo el uso de la proteasa neutra el aislamiento de células vivas de un tejido animal *in vitro*.

Un quinto aspecto de todos los modos de realización como se divulga en el presente documento es un kit de partes que comprende en un compartimento sellado un liofilizado de una proteasa neutra obtenida realizando un procedimiento para producir de forma recombinante una proteasa neutra como se divulga en el presente documento.

Un sexto aspecto de todos los modos de realización como se divulga en el presente documento es un procedimiento para preparar una combinación de una pluralidad de proteasas, que comprende las etapas de (a) proporcionar una proteasa neutra producida de forma recombinante obtenida realizando un procedimiento obtenido realizando un procedimiento para producir de forma recombinante una proteasa neutra como se divulga en el presente documento, y (b) mezclar la proteasa neutra de la etapa (a) con otra proteasa.

Un séptimo aspecto de todos los modos de realización como se divulga en el presente documento es una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la posición 289 a la posición 592 de la SEQ ID NO: 5, seleccionándose la secuencia de nucleótidos del grupo que consiste en (a) una secuencia de nucleótidos que tiene la secuencia de la posición 898 a la posición 1811 de la SEQ ID NO: 6; (b) secuencias de nucleótidos derivadas de la secuencia de nucleótidos de la posición 898 a la posición 1811 de la SEQ ID NO: 6 como resultado del código redundante.

Un octavo aspecto de todos los modos de realización como se divulga en el presente documento es un vector que contiene una secuencia de nucleótidos como se divulga en el presente documento.

Un noveno aspecto de todos los modos de realización como se divulga en el presente documento es un organismo huésped grampositivo procariota transformado que contiene al menos un vector como se divulga en el presente documento.

Leyenda de la figura

Figura 1 En el presente documento se divulga la alineación de la secuencia de aminoácidos publicada de Takekawa, S., *et al.*, J. Bacteriology 173 (1991) 6820-6825 (SEQ ID NO: 3; "Seq-1" en la figura) con la secuencia de aminoácidos procedente de la ATCC 21993 de *P. polymyxa* (SEQ ID NO: 5; "Seq-2" en la figura).

Descripción detallada

Dispase® (= proteasa neutra procedente de *Paenibacillus polymyxa*, *P. polymyxa*) es una metaloenzima que se clasifica como una aminoendopeptidasa que puede escindir fibronectina, colágeno IV y colágeno I, pero este último aparentemente en menor grado. La proteasa neutra de *P. polymyxa* es útil para la disociación de tejido (= desagregación) y, particularmente, para los procedimientos de subcultivo, puesto que no daña las membranas celulares. Puesto que la proteasa neutra de *P. polymyxa* de acuerdo con la presente divulgación se puede producir a partir de una fuente bacteriana, está libre de contaminación por micoplasma y virus animal. Es muy estable con respecto a la temperatura, pH e interferencia por los componentes séricos. La actividad de proteasa neutra de *P. polymyxa* se reduce en gran medida mediante dilución, lo que permite que los cultivos en suspensión crezcan sin dificultad. Incluso se puede añadir la proteasa neutra de *P. polymyxa* a los cultivos en suspensión de células para prevenir la aglutinación de células no deseada.

La proteasa neutra de *P. polymyxa* preparada de forma recombinante de acuerdo con la presente divulgación es útil para preparar muchos tipos de células para su cultivo. Por tanto, la proteasa neutra de *P. polymyxa* como se proporciona con el presente documento es un agente rápido, eficaz, pero suave, para separar incluso capas de células, es decir, la epidermis intacta de la dermis y láminas epiteliales intactas en cultivo a partir del sustrato. En

ambos casos, afecta a la separación escindiendo las proteínas de la matriz extracelular en la región de la zona de la membrana basal, mientras que mantiene la viabilidad de las células epiteliales. La proteasa neutra de *P. polymyxa* de acuerdo con la presente divulgación y usada como proteasa única es útil para desprender células epidérmicas como láminas intactas confluentes de la superficie de placas de cultivo sin disociar las células. Dicho procedimiento sienta las bases para el uso en el cultivo e incluso en el trasplante de láminas de células epiteliales de la piel desprendidas del sustrato de cultivo mediante la proteasa neutra de *P. polymyxa*. Además, la proteasa neutra de *P. polymyxa* es útil para la obtención y transferencia de células diploides y líneas de células normales. Otras aplicaciones para la disociación de tejido hacen uso de combinaciones de una proteasa neutra de *P. polymyxa* y otra proteasa, tal como colagenasa.

De acuerdo con los sorprendentes hallazgos de los autores de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para producir de forma recombinante una proteasa neutra, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) proporcionar en un vector de expresión un ADN con una secuencia que codifica una preproenzima de acuerdo con la SEQ ID NO: 5, y transformar un organismo huésped con el vector de expresión, obteniendo de este modo un organismo huésped transformado, en el que el organismo huésped es una especie procariota grampositiva; seguido de (b) expresar el ADN en el organismo huésped transformado, en el que el organismo huésped transformado segrega la proteasa neutra; seguido de (c) aislar la proteasa neutra segregada; produciendo de forma recombinante de este modo la proteasa neutra. Más específicamente, la secuencia de ADN procede de la ATCC 21993 de *Paenibacillus polymyxa*.

La secuencia que codifica la preproenzima de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 se puede expresar en cualquier organismo huésped adecuado conocido por el experto en la técnica. Un organismo huésped particular es una bacteria grampositiva, específicamente una especie seleccionada del grupo que consiste en *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. De acuerdo con la invención, el medio de producir de forma recombinante la proteasa neutra codificada por la SEQ ID NO: 5 hace uso de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* como organismo huésped transformado.

En un modo de realización específico, la etapa de expresar el ADN en el organismo huésped transformado se realiza cultivando el organismo huésped transformado en un medio líquido, en el que el organismo huésped transformado segrega la proteasa neutra en el medio líquido. Posteriormente, la proteasa neutra segregada se puede aislar del medio líquido.

Se puede lograr otra ventaja usando, en cualquiera de los procedimientos para producir de forma recombinante una proteasa neutra, un organismo huésped que carezca de proteasas extracelulares. Los ejemplos de proteasas extracelulares de *B. amyloliquefaciens* son Npr y Apr, bien conocidas para el experto.

En una secuencia de trabajo ejemplar para la disociación de tejido, se proporciona una polimerasa neutra de *P. polymyxa* producida de forma recombinante de acuerdo con la presente divulgación como un liofilizado. En una primera etapa, se disuelve el liofilizado en un tampón adecuado fisiológicamente, por ejemplo, en PBS (solución salina tamponada con fosfato), que esté libre de iones Mg^{2+} y Ca^{2+} . A continuación, se esteriliza la solución de proteasa neutra de *P. polymyxa*, por ejemplo, por medio de filtración a través de una membrana de filtro (por ejemplo, con tamaño de poro de 0,22 μm). Se obtiene una muestra de tejido vivo, es decir, extraída del animal. De forma alternativa, se proporciona un recipiente de cultivo con células adheridas o un recipiente de cultivo con agregados de células (las células también se denominan "tejido" en el presente documento). En un modo de realización particular, se fragmenta el tejido mediante medios mecánicos (por ejemplo, usando tijeras o un bisturí) y se lavan los fragmentos en PBS estéril. Posteriormente, se incuban los fragmentos en una solución de proteasa neutra de *P. polymyxa* precalentada, con lo que los fragmentos se cubren con la solución. La incubación con la proteasa neutra de *P. polymyxa* se realiza típicamente a temperatura fisiológica, particularmente a 37 °C.

El tiempo necesario para la disociación de tejido deseada (es decir, el grado o la extensión de la misma) normalmente se determina empíricamente, en el que se varían típicamente la concentración de proteasa neutra de *P. polymyxa* en la solución y/o el tiempo de incubación. El tiempo de incubación en la solución de proteasa neutra de *P. polymyxa* puede ser de varias horas sin efectos adversos en las células. Opcionalmente el tejido incubado se puede agitar suavemente. Si fuera necesario, se pueden separar las células dispersadas de los agregados que existen todavía por medio del paso de la suspensión de células obtenida a través de una malla o rejilla estéril. La decantación también es un procedimiento para obtener células disociadas. Otras técnicas son conocidas para el experto en la técnica, particularmente para retirar capas de células que se desprenden por debajo del tejido mediante incubación con una proteasa neutra de *P. polymyxa*. Si se desea una desagregación adicional, se puede añadir una solución de Dispase recién preparada.

Se pueden sedimentar células o capas de células disociadas, se puede retirar la solución enzimática mediante decantación o se diluye la solución de proteasa neutra de *P. polymyxa* con medio de cultivo de células para inhibir la actividad proteolítica adicional. Son posibles otros procedimientos para hacer esto. Se pueden sembrar y cultivar las células obtenidas mediante la secuencia de trabajo anterior usando procedimientos estándar.

Por tanto, la presente divulgación proporciona además un procedimiento para aislar células vivas de un tejido animal *in vitro*, que comprende las etapas de (a) proporcionar una proteasa neutra producida de forma recombinante obtenida

realizando un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y (b) incubar el tejido *in vitro* con la proteasa neutra de la etapa (a), en el que los componentes proteínicos de la matriz extracelular del tejido se degradan proteolíticamente, y en el que se obtiene una capa de células o una suspensión de células individuales. Específicamente, el tejido animal procede de un animal vertebrado, más específicamente de una especie animal seleccionada de ratón, conejillo de Indias, hámster, rata, perro, oveja, cabra, cerdo, bovino, caballo, una especie de primate, y ser humano.

En otro modo de realización, un procedimiento para aislar células vivas de un tejido animal *in vitro* comprende el uso de una combinación de proteasas que incluye una proteasa neutra de *P. polymyxa* producida de forma recombinante como se divulga en el presente documento. A modo de ejemplo, la combinación puede comprender otra proteasa neutra, tal como termolisina. Además, las combinaciones de proteasa neutra de *P. polymyxa* con una colagenasa proporcionan una gran ventaja para la disociación de tejido.

En un modo de realización específico, se proporciona una proteasa neutra de *P. polymyxa* producida de forma recombinante como se divulga en el presente documento o una combinación de proteasas que incluye una proteasa neutra de *P. polymyxa* producida de forma recombinante como se divulga en el presente documento como un liofilizado, es decir, como una preparación criodesecada. Dicha preparación se puede almacenar durante un periodo de tiempo prolongado.

Además, se proporciona un kit de partes que comprende en un compartimento sellado, tal como un frasco, un liofilizado de una proteasa neutra obtenida realizando un procedimiento para producir de forma recombinante una proteasa neutra, como se divulga en el presente documento. El kit puede contener en un compartimento sellado separado una preparación liofilizada de una colagenasa. El kit también puede contener en un compartimento sellado separado una preparación liofilizada de una termolisina. Otro modo de realización es un kit que comprende en un compartimento sellado, tal como un frasco, un liofilizado de una proteasa neutra obtenida realizando un procedimiento para producir de forma recombinante una proteasa neutra, como se divulga en el presente documento, en el que la proteasa neutra se combina con otra proteasa, tal como (pero sin limitarse a) una colagenasa y/o termolisina.

Se proporcionan los siguientes ejemplos y el listado de secuencias para ayudar a la comprensión de la presente invención.

Ejemplo 1

Construcción de construcciones de expresión (ADN)

Usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y varios oligonucleótidos de ADN mono- y/o bicatenario que representan subsecuencias de las cadenas de ADN genómico codificantes y no codificantes deseadas, se generaron secuencias de genes artificiales. Para empezar, los pares de oligonucleótidos parcialmente superpuestos que representaban fragmentos de cadenas opuestas se hibridaron con el ADN molde y se generaron moléculas de ADN bicatenario mediante prolongación de cadena mediada por polimerasa y posterior amplificación por PCR. Se crearon sintéticamente otras moléculas de ADN. Se verificaron todas las secuencias de ADN generados artificialmente mediante secuenciación.

Ejemplo 2

Construcciones de expresión que usan información sobre la secuencia publicada

Un primer intento de expresar una proteasa neutra de *P. polymyxa* se basó en la divulgación de Takekawa, S., *et al.*, J. Bacteriology 173 (1991) 6820-6825. En una primera etapa, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, específicamente la subsecuencia de CDS (343)..(2115) correspondiente al marco abierto de lectura que codifica la SEQ ID NO: 2, se adaptó cambiando el uso del codones. Aunque la secuencia de aminoácidos codificada permaneció sin cambios, se introdujeron mutaciones neutras que optimizaban el marco abierto de lectura para la expresión en *Bacillus subtilis*. Se creó y sintetizó un ADN artificial con el marco de lectura que codifica la SEQ ID NO: 2. Codificaba la secuencia de aminoácidos de *P. polymyxa* de la preproenzima con 590 aminoácidos, es decir, incluyendo la secuencia señal y el propéptido. En la construcción de expresión, se introdujo un sitio de unión a ribosoma específico de *B. subtilis* en dirección 5' del marco abierto de lectura. Se clonó la construcción de ADN en un vector de expresión que proporciona un promotor específico de la fase de crecimiento que promueve la transcripción en *B. subtilis* en la fase de crecimiento estacionaria en cultivo líquido. El plásmido de expresión seleccionable y competente para la replicación resultante fue pLE2D01nprPp.

Se construyó un derivado fusionando tres glicinas y seis histidinas al extremo C de la secuencia de aminoácidos de la preproenzima, dando como resultado un polipéptido codificado con 599 aminoácidos con seis histidinas terminales. El plásmido de expresión seleccionable y competente para la replicación resultante fue pLE2D01nprHisPp.

Se generaron cepas de *B. subtilis* transformadas y se realizaron experimentos de expresión en condiciones estándar; es decir, se aplicaron condiciones en el caso de que otras dianas de expresión hubieran demostrado ser permisivas

con la expresión y secreción de cantidades detectables de proteína diana.

Sorprendentemente, ambos plásmidos de expresión, pLE2D01nprPp y pLE2D01nprHisPp, dieron lugar a resultados negativos. Ambos intentos de expresar y segregar la proteasa neutra de *P. polymyxa* fueron infructuosos.

Para excluir cualquier impacto negativo de la secuencia promotora, aunque dicho efecto se considerara improbable, se intercambió el promotor en cada uno de los dos plásmidos anteriores con otro promotor que promovía la expresión dependiente de la adición de un compuesto inductor específico al cultivo. Los plásmidos de expresión resultantes se denominaron pLE2E01nprPp y pLE2E01nprHisPp. Se realizaron experimentos de expresión que incluían la etapa de adición del inductor. Como resultado, estas modificaciones no dieron lugar a un cambio. Ambos intentos adicionales de expresar y segregar la proteasa neutra de *P. polymyxa* fueron infructuosos.

En otro intento, se intercambió el sitio de unión a ribosoma específico de *B. subtilis* con el sitio de unión a ribosoma de *P. polymyxa* natural del gen descrito originalmente (SEQ ID NO: 1). Los plásmidos de expresión resultantes se denominaron pLE2D01nprRBSpp y pLE2D01nprRBSHisPp. De nuevo, los resultados negativos no se pudieron anular. Ambos intentos adicionales de expresar y segregar la proteasa neutra de *P. polymyxa* fueron infructuosos.

Además, se realizaron experimentos de mutación alterando/deleccionando posiciones de aminoácido relacionadas con la discrepancia de secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3, es decir, mediante la secuencia de aminoácidos del extremo N de la proteasa neutra natural aislada del sobrenadante de cultivo de *Paenibacillus polymyxa*.

Sorprendente e inesperadamente, ninguno de los intentos directos anteriores de expresar la proteasa neutra de *P. polymyxa* en *Bacillus subtilis* dio lugar a una actividad de proteasa que estaba por encima de la de fondo, en comparación con una cepa de control de *B. subtilis* transformada con un vector de expresión "vacío", es decir, con un vector que comprendía las mismas características descritas anteriormente, pero sin ninguna secuencia codificante deseada insertada. Se obtuvieron resultados idénticos cuando se usó *B. amyloliquefaciens* como huésped de expresión.

A este respecto se observa que las secuencias publicadas por Takekawa, S., *et al.*, J. Bacteriology 173 (1991) 6820-6825 se clonaron y seleccionaron en *E. coli*, es decir, en un organismo microbiano que no estaba relacionado con *P. polymyxa*, taxonómicamente y en términos evolutivos. Se puede especular que ese paso a través de un huésped tan distinto podría haber dado lugar a alteraciones del ADN exógeno. Además, Takekawa, S., *et al.* (*supra*) caracterizaron la expresión de la proteasa neutra en *E. coli* usando extractos celulares. Sin embargo, los clones positivos se identificaron inicialmente basándose en un halo en placas de agar con leche desnatada, lo que sugiere alguna actividad de proteasa extracelular en una fase inicial del estudio.

No se ha descubierto el motivo exacto para explicar por qué la secuencia publicada de Takekawa, S., *et al.* (*supra*) no da lugar a una expresión detectable de la proteasa neutra, al menos en cuanto a lo que atañe al sistema de *B. subtilis*. No obstante, se realizó otro intento de aclarar si la información sobre la secuencia documentada por Takekawa S. *et al.* (*supra*) podría no representar el verdadero gen de *Paenibacillus polymyxa*.

Ejemplo 3

Resultados de secuenciación para la cepa ATCC 21993 de *Paenibacillus polymyxa*

Se aisló el ADN genómico total aislado de la cepa ATCC 21993 de *Paenibacillus polymyxa* y se amplificó el gen que codificaba la proteasa neutra usando PCR. Se secuenció el ADN amplificado. Sorprendentemente, se descubrieron varias diferencias al nivel de secuencia de ADN, provocando las diferencias cambios en la secuencia de aminoácidos que está codificada. La secuencia de aminoácidos del gen de proteasa neutra de la cepa ATCC 21993 se proporciona en la SEQ ID NO: 5.

Al nivel de secuencia de aminoácidos, en la figura 1 se presenta una alineación con la secuencia publicada de Takekawa, S., *et al.* (*supra*). La alineación muestra una serie de intercambios de aminoácidos e incluso una delección y una inserción. 17 de los intercambios de aminoácidos podrían ser de pertinencia estructural de orden más alto, puesto que en estos casos los aminoácidos no son similares (tamaño, carga), pero difieren significativamente.

Notablemente, la secuencia de aminoácidos determinada en el presente estudio contenía el extremo N determinado anteriormente por Takegawa S. *et al.* (*supra*). Por tanto, las posiciones 289 a 303 de la SEQ ID NO: 5 corresponden a la secuencia del extremo N determinada previamente de la SEQ ID NO: 4. De acuerdo con los presentes datos de secuenciación, tras un procedimiento de maduración proteolítico, incluyendo un procesamiento proteolítico en el extremo N durante el transcurso de la secreción, la proteasa neutra extracelular derivada de la cepa ATCC 21993 es el polipéptido dado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 desde la posición 289 a la posición 592.

Ejemplo 4

Construcciones de expresión que usan información sobre la secuencia publicada

Se aisló el ADN que codificaba la proteasa neutra de la cepa ATCC 21993 de *Paenibacillus polymyxa* como se describe en el ejemplo 3. Basándose en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, se concibió una secuencia de ADN para su expresión en *B. subtilis* que codificaba la proteasa neutra y se clonó en vectores de expresión diferentes, en analogía con el ejemplo 2. La secuencia de ADN de un fragmento clonado que incluye la secuencia codificante de la proteasa neutra (preproenzima) de dicha cepa ATCC 21993 de *Paenibacillus polymyxa* se presenta como la SEQ ID NO: 6. Una construcción ejemplar codificaba la secuencia de aminoácidos de *P. polymyxa* de la preproenzima, incluyendo la secuencia señal y el propéptido. Se clonó la construcción de ADN en un vector de expresión que proporciona un promotor específico de la fase de crecimiento que promueve la transcripción en *B. subtilis* en la fase de crecimiento estacionaria en cultivo líquido. El plásmido de expresión seleccionable y competente para la replicación resultante fue pLE2D01DisnatPp.

Se intentó además construir un derivado fusionando una secuencia de marca de tres glicinas consecutivas seguidas de seis histidinas al extremo C de la secuencia de aminoácidos de la preproenzima. Los experimentos de transformación respectivos proporcionaron clones que en placas de agar con leche produjeron halos indicativos de la secreción de proteasa. Por tanto, la producción recombinante de la proteasa neutra es posible en *B. subtilis*.

Las cepas de *B. subtilis* transformadas se caracterizaron adicionalmente. La secuenciación de los plásmidos de expresión reveló sorprendentemente que todos estos clones contenían marcos abiertos de lectura específicos de proteasa neutra en los que se había perdido la marca de histidina añadida. En el sistema de expresión de *B. subtilis* particular, la estructura de marca His adjunta al extremo C podría haber sido incompatible con la expresión y/o secreción de la enzima proteasa neutra recombinante activa proteolíticamente. Por tanto, no se continuó más con este intento y no se generó ningún clon que expresara activamente una proteasa neutra con marca His recombinante en el sistema de *B. subtilis*.

Sin embargo, se transformó el plásmido de expresión pLE2D01DisnatPp en varias especies de *Bacillus*, no solo incluyendo *Bacillus subtilis*, sino también *Bacillus amyloliquefaciens*. Se realizaron transformaciones de control con vectores de expresión "vacíos", como se describe anteriormente.

Sorprendentemente, en cultivos líquidos, las cepas huésped de *Bacillus amyloliquefaciens* transformadas segregaron cantidades particularmente altas de proteasa neutra en el medio, mientras que en las mismas condiciones no se observaron actividades de proteasa neutra significativas en el sobrenadante de cultivo con *Bacillus subtilis*. El efecto no parecía ser dependiente de la composición del medio líquido. El motivo de esta observación inesperada no se aclaró.

Las cepas huésped de *Bacillus subtilis* transformadas particulares usadas para la transformación contenían mutaciones con pérdida de función en uno o más genes endógenos que codificaban una proteasa extracelular (segregada). Dichas cepas se consideran ventajosas, particularmente en el presente caso cuando la proteína diana deseada que se va a expresar de forma recombinante y a segregar es una proteasa en sí misma. Particularmente en el huésped de *B. subtilis* transformado, se mutaron genes seleccionados de AprE, NprE, Epr, y una combinación de los mismos. Además, se obtuvieron cepas en las que se mutaron los tres de estos genes.

Con respecto a *Bacillus amyloliquefaciens*, las mutaciones ventajosas en la cepa huésped incluían los genes de proteasa extracelular endógenos Npr y Apr. Se generaron transformantes respectivos que incluían una o ambas de las dos mutaciones con pérdida de función en la proteasa mencionadas anteriormente.

Ejemplo 5

Determinación de la actividad proteolítica en medio líquido

Se usaron los kits de ensayo de proteasa EnzChek® (Invitrogen, E6638). El ensayo basado en fluorescencia directa detecta metaloproteasas, serina proteasas, proteasas ácidas y sulfhidrilproteasas. El kit de ensayo contiene derivados de caseína que se marcan con el colorante BODIPY® FL (E6638) verde fluorescente insensible al pH, lo que da como resultado una extinción casi total de la fluorescencia del conjugado. La hidrólisis catalizada por proteasa libera péptidos marcados con colorante BODIPY FL fluorescente. El incremento concurrente de la fluorescencia, que se puede medir con un espectrofluorómetro, minifluorómetro o lector de microplacas, es proporcional a la actividad de proteasa.

Los experimentos de control se realizaron con muestras en las que no se expresó proteasa neutra ("muestras nulas"). Se realizaron controles adicionales con muestras, incluyendo "muestras nulas", a las que se añadió una cantidad predeterminada de proteasa neutra disponible comercialmente (Dispase®, Roche Diagnostics Mannheim, Alemania, n.º de cat. 04942086001).

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (DE) F. Hoffmann-La Roche AG, Basilea (CH)	
5	<120>	Proteasa neutra producida de forma recombinante procedente de <i>Paenibacillus polymyxa</i>	
	<130>	31091	
10	<150>	EP12175563.1	
	<151>	09-07-2012	
	<160>	7	
15	<170>	PatentIn versión 3.5	
	<210>	1	
	<211>	2418	
	<212>	ADN	
20	<213>	<i>Bacillus polymyxa</i> 72	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
25	<223>	Gen npr de <i>Paenibacillus polymyxa</i> para proteasa neutra extracelular, secuencia genómica de "proteasa neutra extracelular" divulgada por Takekawa, S., Uozumi, N., Tsukagoshi, N. y Udaka, S. (J. Bacteriol. 173 (21), 6820-6825 (1991)) Genbank: D00861.1	
	<220>		
30	<221>	CDS	
	<222>	(343)..(2115)	
	<400>	1	
		gatcttctcg tccgtcattc tctgtgctaa tatcagagcc agatgatggg agttcgaaaa	60
		atcatctttt gttttttttg cataaggcaa cttttttcca ttatccgctt ttatccacta	120
		tctttttata cgacaggaag ggagggggtt gttacctttt taggctactt gcttcaaattg	180
		cagtaccctt ttttcacgca cgcttcatga aaaacacttc ggtattttctc ttcatgttcc	240
		attcttctat tccagacgac aacacgacct acataaatgg cgtaatgcct tattcaaagc	300
		aggataattc gtcctgacat taatcgagga gagtgaattt tt atg aaa aaa gta	354
		Met Lys Lys Val	
		1	
		tgg ttt tcg ctt ctt gga gga gct atg tta tta ggg tct gtg gcg tct	402
		Trp Phe Ser Leu Leu Gly Gly Ala Met Leu Leu Gly Ser Val Ala Ser	
		5 10 15 20	
		ggt gca tct gcg gag agt tcc gtt tcg gga cca gca cag ctt aca ccg	450
		Gly Ala Ser Ala Glu Ser Ser Val Ser Gly Pro Ala Gln Leu Thr Pro	
		25 30 35	
		acc ttc cac acc gag caa tgg aaa gct cct tcc tcg gta tca ggg gac	498
		Thr Phe His Thr Glu Gln Trp Lys Ala Pro Ser Ser Val Ser Gly Asp	
		40 45 50	
		gac att gta tgg agc tat ttg aat cga caa aag aaa tcg tta ctg ggt	546
		Asp Ile Val Trp Ser Tyr Leu Asn Arg Gln Lys Lys Ser Leu Leu Gly	

ES 2 701 763 T3

55	60	65	
gtg gat agc tcc agt gta cgt gaa caa ttc cga atc gtt gat cgc aca Val Asp Ser Ser Ser Val Arg Glu Gln Phe Arg Ile Val Asp Arg Thr 70 75 80			594
agc gac aag tcc ggt gtg agc cat tat cga ctg aag cag tat gta aac Ser Asp Lys Ser Gly Val Ser His Tyr Arg Leu Lys Gln Tyr Val Asn 85 90 95 100			642
ggg att ccc gta tat gga gct gag caa act att cat gtg ggc aaa tct Gly Ile Pro Val Tyr Gly Ala Glu Gln Thr Ile His Val Gly Lys Ser 105 110 115			690
ggt gag gtc acc tct tac tta gga gcg gtg att aat gag gat cag cag Gly Glu Val Thr Ser Tyr Leu Gly Ala Val Ile Asn Glu Asp Gln Gln 120 125 130			738
gaa gaa gct acg caa ggt aca act cca aaa atc agc gct tct gaa gcg Glu Glu Ala Thr Gln Gly Thr Thr Pro Lys Ile Ser Ala Ser Glu Ala 135 140 145			786
gtt tac acc gca tat aaa gaa gca gct gca cgt att gaa gcc ctc cct Val Tyr Thr Ala Tyr Lys Glu Ala Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Pro 150 155 160			834
acc tcc gac gat act att tct aaa gac gct gag gag cca agc agt gta Thr Ser Asp Asp Thr Ile Ser Lys Asp Ala Glu Glu Pro Ser Ser Val 165 170 175 180			882
agt aaa gat act tac gcc gaa gca gct aac aac gac aaa acg ctt tct Ser Lys Asp Thr Tyr Ala Glu Ala Ala Asn Asn Asp Lys Thr Leu Ser 185 190 195			930
gtt gat aag gac gag ctg agt ctt gat aag gca tct gtc ctg aaa gat Val Asp Lys Asp Glu Leu Ser Leu Asp Lys Ala Ser Val Leu Lys Asp 200 205 210			978
agc aaa att gaa gca gtg gag gcc gaa aaa agt tcc att gcc aaa atc Ser Lys Ile Glu Ala Val Glu Ala Glu Lys Ser Ser Ile Ala Lys Ile 215 220 225			1026
gct aat cta cag cct gaa gta gat cct aaa gca gaa ctc tac tac tac Ala Asn Leu Gln Pro Glu Val Asp Pro Lys Ala Glu Leu Tyr Tyr Tyr 230 235 240			1074
cct aaa ggg gat gac ctg ctg cta gtt tat gtg aca gaa gtt aat gtt Pro Lys Gly Asp Asp Leu Leu Leu Val Tyr Val Thr Glu Val Asn Val 245 250 255 260			1122
tta gaa cct gcc cca ctg cgt acc cgc tac att att gat gcc aat gac Leu Glu Pro Ala Pro Leu Arg Thr Arg Tyr Ile Ile Asp Ala Asn Asp 265 270 275			1170
ggc agc atc gta ttc cag tat gac atc att aat gaa gcg aca ggt aaa Gly Ser Ile Val Phe Gln Tyr Asp Ile Ile Asn Glu Ala Thr Gly Lys 280 285 290			1218
ggt gtg ctt ggt gat tcc aaa tcg ttc act act acc gct tcc ggc agt Gly Val Leu Gly Asp Ser Lys Ser Phe Thr Thr Thr Ala Ser Gly Ser 295 300 305			1266
agc tac cag tta aaa gat acc aca cgc ggt aac ggt atc gtg act tac			1314

Ser	Tyr	Gln	Leu	Lys	Asp	Thr	Thr	Arg	Gly	Asn	Gly	Ile	Val	Thr	Tyr	
310						315					320					
acg	gcc	tcc	aac	cgc	caa	agc	atc	cca	ggc	acc	ctt	ttg	aca	gat	gct	1362
Thr	Ala	Ser	Asn	Arg	Gln	Ser	Ile	Pro	Gly	Thr	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	
325					330					335					340	
gat	aat	gta	tgg	aat	gat	cca	gcc	ggg	gtg	gat	gcc	cat	gcg	tat	gct	1410
Asp	Asn	Val	Trp	Asn	Asp	Pro	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	His	Ala	Tyr	Ala	
				345					350					355		
gcc	aaa	acc	tat	gat	tac	tat	aaa	tcc	aaa	ttt	gga	cgc	aac	agc	att	1458
Ala	Lys	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Lys	Phe	Gly	Arg	Asn	Ser	Ile	
			360					365					370			
gac	gga	cgt	ggg	ctg	caa	ctc	cgt	tcg	aca	gtc	cat	tac	ggc	agc	cgc	1506
Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Thr	Val	His	Tyr	Gly	Ser	Arg	
		375					380					385				
tac	aac	aac	gct	ttc	tgg	aac	ggc	tcc	caa	atg	act	tat	gga	gat	gga	1554
Tyr	Asn	Asn	Ala	Phe	Trp	Asn	Gly	Ser	Gln	Met	Thr	Tyr	Gly	Asp	Gly	
	390					395					400					
gat	gga	gac	ggg	agc	aca	ttt	atc	gcc	ttc	agc	ggg	gac	ccc	gat	gta	1602
Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Phe	Ile	Ala	Phe	Ser	Gly	Asp	Pro	Asp	Val	
405					410					415					420	
gta	ggg	cat	gaa	ctt	aca	cat	ggg	gtc	aca	gag	tat	act	tcg	aat	ttg	1650
Val	Gly	His	Glu	Leu	Thr	His	Gly	Val	Thr	Glu	Tyr	Thr	Ser	Asn	Leu	
				425					430					435		
gaa	tat	tac	gga	gag	tcc	ggc	gca	ttg	aat	gag	gct	ttc	tcg	gac	gtt	1698
Glu	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Ser	Gly	Ala	Leu	Asn	Glu	Ala	Phe	Ser	Asp	Val	
			440					445					450			
atc	ggg	aat	gac	att	caa	cgc	aaa	aac	tgg	ctt	gta	ggc	gat	gat	att	1746
Ile	Gly	Asn	Asp	Ile	Gln	Arg	Lys	Asn	Trp	Leu	Val	Gly	Asp	Asp	Ile	
		455					460					465				
tat	acg	cca	aac	att	tgc	ggc	gat	gcc	ctt	cgc	tca	atg	tcc	aat	cct	1794
Tyr	Thr	Pro	Asn	Ile	Cys	Gly	Asp	Ala	Leu	Arg	Ser	Met	Ser	Asn	Pro	
	470					475					480					
act	ctg	tac	gat	caa	cca	cat	cac	tat	tcc	aac	ctg	tat	aaa	ggc	agc	1842
Thr	Leu	Tyr	Asp	Gln	Pro	His	His	Tyr	Ser	Asn	Leu	Tyr	Lys	Gly	Ser	
485					490					495					500	
tcc	gat	aac	ggc	ggc	gtt	cat	aca	aac	agc	ggg	att	atc	aat	aaa	gcc	1890
Ser	Asp	Asn	Gly	Gly	Val	His	Thr	Asn	Ser	Gly	Ile	Ile	Asn	Lys	Ala	
				505					510					515		
tac	tac	ttg	ttg	gca	caa	ggc	ggg	act	ttc	cat	ggc	gtt	act	gta	aat	1938
Tyr	Tyr	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Gly	Thr	Phe	His	Gly	Val	Thr	Val	Asn	
				520				525					530			
gga	att	ggg	cgc	gat	gct	gcg	gtg	caa	att	tat	tat	agt	gcc	ttt	acg	1986
Gly	Ile	Gly	Arg	Asp	Ala	Ala	Val	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Phe	Thr	
			535				540					545				
aac	tac	ctg	act	tct	tct	tcc	gac	ttc	tcc	aac	gca	cgt	gct	gct	gtg	2034
Asn	Tyr	Leu	Thr	Ser	Ser	Ser	Asp	Phe	Ser	Asn	Ala	Arg	Ala	Ala	Val	
	550					555					560					

ES 2 701 763 T3

atc caa gcc gca aaa gat ctg tac ggg gcg aac tca gca gaa gca act 2082
Ile Gln Ala Ala Lys Asp Leu Tyr Gly Ala Asn Ser Ala Glu Ala Thr
565 570 575 580

gca gct gcc aag tct ttt gac gct gta ggc taa actaaatcat atacacgatc 2135
Ala Ala Ala Lys Ser Phe Asp Ala Val Gly
585 590

ctcctcattt tctgtccata gacctttgcc attgtgcaac tgtcacttgg ctctgccata 2195

ccatggacga aaaatagggg tgcagtgtac aagtctgcac cccttccccc cttatttatg 2255

gcgccccctc aaagggtcc ttttctctta taaaagtaat cctgtatctc ttgctttttg 2315

cacagcttct tctcgattgt tgactccagc ttgacataga gagtggaggc gaattcttac 2375

tgtccgtgga taggtaagtt ctcagaattg tttatacgtt ctg 2418

<210> 2

<211> 590

<212> PRT

<213> *Bacillus polymyxa* 72

<400> 2

Met Lys Lys Val Trp Phe Ser Leu Leu Gly Gly Ala Met Leu Leu Gly
1 5 10 15

Ser Val Ala Ser Gly Ala Ser Ala Glu Ser Ser Val Ser Gly Pro Ala
20 25 30

Gln Leu Thr Pro Thr Phe His Thr Glu Gln Trp Lys Ala Pro Ser Ser
35 40 45

Val Ser Gly Asp Asp Ile Val Trp Ser Tyr Leu Asn Arg Gln Lys Lys
50 55 60

Ser Leu Leu Gly Val Asp Ser Ser Ser Val Arg Glu Gln Phe Arg Ile
65 70 75 80

Val Asp Arg Thr Ser Asp Lys Ser Gly Val Ser His Tyr Arg Leu Lys
85 90 95

Gln Tyr Val Asn Gly Ile Pro Val Tyr Gly Ala Glu Gln Thr Ile His
100 105 110

Val Gly Lys Ser Gly Glu Val Thr Ser Tyr Leu Gly Ala Val Ile Asn
115 120 125

Glu Asp Gln Gln Glu Glu Ala Thr Gln Gly Thr Thr Pro Lys Ile Ser
130 135 140

Ala Ser Glu Ala Val Tyr Thr Ala Tyr Lys Glu Ala Ala Ala Arg Ile

ES 2 701 763 T3

145		150		155		160									
Glu	Ala	Leu	Pro	Thr	Ser	Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Glu	Glu
				165					170					175	
Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Lys	Asp	Thr	Tyr	Ala	Glu	Ala	Ala	Asn	Asn	Asp
			180					185					190		
Lys	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Lys	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Asp	Lys	Ala	Ser
		195					200					205			
Val	Leu	Lys	Asp	Ser	Lys	Ile	Glu	Ala	Val	Glu	Ala	Glu	Lys	Ser	Ser
	210					215					220				
Ile	Ala	Lys	Ile	Ala	Asn	Leu	Gln	Pro	Glu	Val	Asp	Pro	Lys	Ala	Glu
225					230					235					240
Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Lys	Gly	Asp	Asp	Leu	Leu	Leu	Val	Tyr	Val	Thr
				245					250					255	
Glu	Val	Asn	Val	Leu	Glu	Pro	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Arg	Tyr	Ile	Ile
			260					265					270		
Asp	Ala	Asn	Asp	Gly	Ser	Ile	Val	Phe	Gln	Tyr	Asp	Ile	Ile	Asn	Glu
		275					280					285			
Ala	Thr	Gly	Lys	Gly	Val	Leu	Gly	Asp	Ser	Lys	Ser	Phe	Thr	Thr	Thr
	290					295					300				
Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gln	Leu	Lys	Asp	Thr	Thr	Arg	Gly	Asn	Gly
305					310					315					320
Ile	Val	Thr	Tyr	Thr	Ala	Ser	Asn	Arg	Gln	Ser	Ile	Pro	Gly	Thr	Leu
				325					330					335	
Leu	Thr	Asp	Ala	Asp	Asn	Val	Trp	Asn	Asp	Pro	Ala	Gly	Val	Asp	Ala
			340					345					350		
His	Ala	Tyr	Ala	Ala	Lys	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Lys	Phe	Gly
		355					360					365			
Arg	Asn	Ser	Ile	Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Thr	Val	His
	370					375					380				
Tyr	Gly	Ser	Arg	Tyr	Asn	Asn	Ala	Phe	Trp	Asn	Gly	Ser	Gln	Met	Thr
385					390					395					400

ES 2 701 763 T3

Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Asp Gly Ser Thr Phe Ile Ala Phe Ser Gly
 405 410 415
 Asp Pro Asp Val Val Gly His Glu Leu Thr His Gly Val Thr Glu Tyr
 420 425 430
 Thr Ser Asn Leu Glu Tyr Tyr Gly Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ala
 435 440 445
 Phe Ser Asp Val Ile Gly Asn Asp Ile Gln Arg Lys Asn Trp Leu Val
 450 455 460
 Gly Asp Asp Ile Tyr Thr Pro Asn Ile Cys Gly Asp Ala Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Met Ser Asn Pro Thr Leu Tyr Asp Gln Pro His His Tyr Ser Asn Leu
 485 490 495
 Tyr Lys Gly Ser Ser Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile
 500 505 510
 Ile Asn Lys Ala Tyr Tyr Leu Leu Ala Gln Gly Gly Thr Phe His Gly
 515 520 525
 Val Thr Val Asn Gly Ile Gly Arg Asp Ala Ala Val Gln Ile Tyr Tyr
 530 535 540
 Ser Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Thr Ser Ser Ser Asp Phe Ser Asn Ala
 545 550 555 560
 Arg Ala Ala Val Ile Gln Ala Ala Lys Asp Leu Tyr Gly Ala Asn Ser
 565 570 575
 Ala Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Phe Asp Ala Val Gly
 580 585 590

<210> 3

<211> 590

5 <212> PRT

<213> *Bacillus polymyxa* 72

<220>

<221> misc_feature

10 <223> preproenzima con 590 aminoácidos de acuerdo con Takekawa S. *et al.* J. Bacteriology 173 (1991) 6820-6825

<400> 3

ES 2 701 763 T3

Met 1	Lys	Lys	Val 5	Trp	Phe	Ser	Leu	Leu	Gly 10	Gly	Ala	Met	Leu 15	Leu	Gly
Ser	Val	Ala 20	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	Glu 25	Ser	Ser	Val	Ser	Gly 30	Pro	Ala
Gln	Leu 35	Thr	Pro	Thr	Phe	His	Thr 40	Glu	Gln	Trp	Lys	Ala 45	Pro	Ser	Ser
Val 50	Ser	Gly	Asp	Asp	Ile 55	Val	Trp	Ser	Tyr	Leu 60	Asn	Arg	Gln	Lys	Lys
Ser 65	Leu	Leu	Gly	Val	Asp 70	Ser	Ser	Ser	Val	Arg 75	Glu	Gln	Phe	Arg	Ile 80
Val	Asp	Arg	Thr	Ser 85	Asp	Lys	Ser	Gly	Val 90	Ser	His	Tyr	Arg	Leu 95	Lys
Gln	Tyr	Val 100	Asn	Gly	Ile	Pro	Val 105	Tyr	Gly	Ala	Glu	Gln	Thr 110	Ile	His
Val	Gly 115	Lys	Ser	Gly	Glu	Val	Thr 120	Ser	Tyr	Leu	Gly	Ala 125	Val	Ile	Asn
Glu 130	Asp	Gln	Gln	Glu	Glu 135	Ala	Thr	Gln	Gly	Thr 140	Thr	Pro	Lys	Ile	Ser
Ala 145	Ser	Glu	Ala	Val	Tyr 150	Thr	Ala	Tyr	Lys	Glu 155	Ala	Ala	Ala	Arg	Ile 160
Glu	Ala	Leu	Pro	Thr 165	Ser	Asp	Asp	Thr	Ile 170	Ser	Lys	Asp	Ala 175	Glu	Glu
Pro	Ser	Ser 180	Val	Ser	Lys	Asp	Thr	Tyr 185	Ala	Glu	Ala	Ala	Asn 190	Asn	Asp
Lys	Thr 195	Leu	Ser	Val	Asp	Lys	Asp 200	Glu	Leu	Ser	Leu	Asp 205	Lys	Ala	Ser
Val 210	Leu	Lys	Asp	Ser	Lys	Ile 215	Glu	Ala	Val	Glu	Ala 220	Glu	Lys	Ser	Ser
Ile 225	Ala	Lys	Ile	Ala	Asn 230	Leu	Gln	Pro	Glu	Val 235	Asp	Pro	Lys	Ala	Glu 240
Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Pro 245	Lys	Gly	Asp	Asp	Leu 250	Leu	Leu	Val	Tyr	Val 255	Thr
Glu	Val	Asn	Val	Leu	Glu	Pro	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Arg	Tyr	Ile	Ile

ES 2 701 763 T3

260	265	270
Asp Ala Asn Asp Gly Ser Ile Val Phe Gln Tyr Asp Ile Ile Asn Glu 275 280 285		
Ala Thr Gly Lys Gly Val Leu Gly Asp Ser Lys Ser Phe Thr Thr Thr 290 295 300		
Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Lys Asp Thr Thr Arg Gly Asn Gly 305 310 315 320		
Ile Val Thr Tyr Thr Ala Ser Asn Arg Gln Ser Ile Pro Gly Thr Leu 325 330 335		
Leu Thr Asp Ala Asp Asn Val Trp Asn Asp Pro Ala Gly Val Asp Ala 340 345 350		
His Ala Tyr Ala Ala Lys Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Ser Lys Phe Gly 355 360 365		
Arg Asn Ser Ile Asp Gly Arg Gly Leu Gln Leu Arg Ser Thr Val His 370 375 380		
Tyr Gly Ser Arg Tyr Asn Asn Ala Phe Trp Asn Gly Ser Gln Met Thr 385 390 395 400		
Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Asp Gly Ser Thr Phe Ile Ala Phe Ser Gly 405 410 415		
Asp Pro Asp Val Val Gly His Glu Leu Thr His Gly Val Thr Glu Tyr 420 425 430		
Thr Ser Asn Leu Glu Tyr Tyr Gly Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ala 435 440 445		
Phe Ser Asp Val Ile Gly Asn Asp Ile Gln Arg Lys Asn Trp Leu Val 450 455 460		
Gly Asp Asp Ile Tyr Thr Pro Asn Ile Cys Gly Asp Ala Leu Arg Ser 465 470 475 480		
Met Ser Asn Pro Thr Leu Tyr Asp Gln Pro His His Tyr Ser Asn Leu 485 490 495		
Tyr Lys Gly Ser Ser Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile 500 505 510		

ES 2 701 763 T3

Ile Asn Lys Ala Tyr Tyr Leu Leu Ala Gln Gly Gly Thr Phe His Gly
515 520 525

Val Thr Val Asn Gly Ile Gly Arg Asp Ala Ala Val Gln Ile Tyr Tyr
530 535 540

Ser Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Thr Ser Ser Ser Asp Phe Ser Asn Ala
545 550 555 560

Arg Ala Ala Val Ile Gln Ala Ala Lys Asp Leu Tyr Gly Ala Asn Ser
565 570 575

Ala Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Phe Asp Ala Val Gly
580 585 590

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> *Bacillus polymyxa* 72

<220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia de aminoácidos del extremo N determinada por Takekawa S. *et al.* J. Bacteriology 173 (1991) 6820-6825

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 4
Ala Thr Gly Thr Gly Lys Gly Val Leu Gly Asp Xaa Lys Ser Phe
1 5 10 15

<210> 5
<211> 592
<212> PRT
<213> ATCC21993 de *Paenibacillus polymyxa*

<400> 5
Met Lys Lys Val Trp Val Ser Leu Leu Gly Gly Ala Met Leu Leu Gly
1 5 10 15

Ser Val Ala Ser Gly Ala Ser Ala Glu Ser Ser Val Ser Gly Pro Thr
20 25 30

Gln Leu Thr Pro Thr Phe His Ala Glu Gln Trp Lys Ala Pro Ser Ser
35 40 45

Val Ser Gly Asp Asp Ile Val Trp Ser Tyr Leu Asn Arg Gln Lys Lys
50 55 60

ES 2 701 763 T3

Ser Leu Leu Gly Ala Asp Asp Ser Ser Val Arg Glu Gln Phe Arg Ile
 65 70 75 80
 Val Asp Arg Thr Ser Asp Lys Ser Gly Val Ser His Tyr Arg Leu Lys
 85 90 95
 Gln Tyr Val Asn Gly Ile Pro Val Tyr Gly Ala Glu Gln Thr Ile His
 100 105 110
 Val Gly Lys Ser Gly Glu Val Thr Ser Tyr Leu Gly Ala Val Val Thr
 115 120 125
 Glu Asp Gln Gln Ala Glu Ala Thr Gln Gly Thr Thr Pro Lys Ile Ser
 130 135 140
 Ala Ser Glu Ala Val Tyr Thr Ala Tyr Lys Glu Ala Ala Ala Arg Ile
 145 150 155 160
 Glu Ala Leu Pro Thr Ser Asp Asp Thr Ile Ser Lys Asp Val Glu Glu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Val Ser Lys Asp Thr Tyr Ala Glu Ala Ala Asn Asn Glu
 180 185 190
 Lys Thr Leu Ser Thr Asp Lys Asp Glu Leu Ser Leu Asp Lys Ala Ser
 195 200 205
 Ala Leu Lys Asp Ser Lys Ile Glu Ala Val Glu Ala Glu Lys Ser Ser
 210 215 220
 Ile Ala Lys Ile Ala Asn Leu Gln Pro Glu Val Asp Pro Lys Ala Asp
 225 230 235 240
 Leu Tyr Phe Tyr Pro Lys Gly Asp Asp Leu Gln Leu Val Tyr Val Thr
 245 250 255
 Glu Val Asn Val Leu Glu Pro Ala Pro Leu Arg Thr Arg Tyr Ile Ile
 260 265 270
 Asp Ala Asn Asp Gly Ser Ile Val Phe Gln Tyr Asp Ile Ile Asn Glu
 275 280 285
 Ala Thr Gly Thr Gly Lys Gly Val Leu Gly Asp Thr Lys Ser Phe Thr
 290 295 300
 Thr Thr Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Lys Asp Thr Thr Arg Gly

ES 2 701 763 T3

305					310						315					320
Asn	Gly	Val	Val	Thr	Tyr	Thr	Ala	Ser	Asn	Arg	Gln	Ser	Ile	Pro	Gly	
				325					330					335		
Thr	Ile	Leu	Thr	Asp	Ala	Asp	Asn	Val	Trp	Asn	Asp	Pro	Ala	Gly	Val	
			340					345					350			
Asp	Ala	His	Thr	Tyr	Ala	Ala	Lys	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Lys	
		355					360					365				
Phe	Gly	Arg	Asn	Ser	Ile	Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Thr	
	370					375					380					
Val	His	Tyr	Gly	Ser	Arg	Tyr	Asn	Asn	Ala	Phe	Trp	Asn	Gly	Ser	Gln	
385					390					395					400	
Met	Thr	Tyr	Gly	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Phe	Ile	Ala	Phe	Ser	Gly	
				405					410					415		
Asp	Pro	Asp	Val	Val	Gly	His	Glu	Leu	Thr	His	Gly	Val	Thr	Glu	Tyr	
			420					425					430			
Thr	Ser	Asn	Leu	Glu	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Ser	Gly	Ala	Leu	Asn	Glu	Ala	
		435					440					445				
Phe	Ser	Asp	Val	Ile	Gly	Asn	Asp	Ile	Gln	Arg	Lys	Asn	Trp	Leu	Val	
	450					455					460					
Gly	Asp	Asp	Ile	Tyr	Thr	Pro	Asn	Ile	Ala	Gly	Asp	Ala	Leu	Arg	Ser	
465					470					475					480	
Met	Ser	Asn	Pro	Thr	Leu	Tyr	Asp	Gln	Pro	Asp	His	Tyr	Ser	Asn	Leu	
				485					490					495		
Tyr	Thr	Gly	Ser	Ser	Asp	Asn	Gly	Gly	Val	His	Thr	Asn	Ser	Gly	Ile	
			500					505					510			
Ile	Asn	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Gly	Thr	Phe	His	Gly	
		515					520					525				
Val	Thr	Val	Asn	Gly	Ile	Gly	Arg	Asp	Ala	Ala	Val	Gln	Ile	Tyr	Tyr	
	530					535					540					
Ser	Ala	Phe	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	Ser	Ser	Ser	Asp	Phe	Ser	Asn	Ala	
545					550					555					560	

Arg Ala Ala Val Ile Gln Ala Ala Lys Asp Gln Tyr Gly Ala Asn Ser
565 570 575

Ala Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Phe Asp Ala Val Gly Val Asn
580 585 590

<210> 6
<211> 1898
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una proteasa neutra activa enzimáticamente de *Paenibacillus polymyxa*, teniendo el ADN extremos genomanipulados que facilitan las etapas de clonación

<220>
<221> misc_recomb
<222> (5)..(11)
15 <223> sitio de escisión para restricción con Pae-I generado artificialmente "GCATGC"

<220>
<221> CDS
<222> (34)..(1812)
20

<220>
<221> misc_recomb
<222> (1891)..(1896)
25 <223> sitio de escisión para restricción con Sal-I generado artificialmente "GTCGAC"

<400> 6
gctcgcgatgc caaatgagga gagtgaattt ttg atg aaa aaa gta tgg gtt tcg 54
Met Lys Lys Val Trp Val Ser
1 5

ctt ctt gga gga gct atg tta tta ggg tct gtc gcg tct ggt gca tca 102
Leu Leu Gly Gly Ala Met Leu Leu Gly Ser Val Ala Ser Gly Ala Ser
10 15 20

gcg gag agt tcc gtt tcg ggg cca act cag ctt aca ccg acc ttt cac 150
Ala Glu Ser Ser Val Ser Gly Pro Thr Gln Leu Thr Pro Thr Phe His
25 30 35

gcc gag caa tgg aaa gcc cct tcc tcg gta tcg ggg gac gac att gta 198
Ala Glu Gln Trp Lys Ala Pro Ser Ser Val Ser Gly Asp Asp Ile Val
40 45 50 55

tgg agc tat ttg aat cgg caa aag aaa tcg tta ctg ggt gcg gac gac 246
Trp Ser Tyr Leu Asn Arg Gln Lys Lys Ser Leu Leu Gly Ala Asp Asp
60 65 70

tct agt gta cgt gaa caa ttc cga atc gtt gat cgc aca agc gac aag 294
Ser Ser Val Arg Glu Gln Phe Arg Ile Val Asp Arg Thr Ser Asp Lys
75 80 85

tcc ggt gtg agc cat tat cgg ctg aaa cag tat gta aac ggg att ccc 342
Ser Gly Val Ser His Tyr Arg Leu Lys Gln Tyr Val Asn Gly Ile Pro
90 95 100

gta tat gga gct gaa cag act att cat gtg ggc aaa tct ggt gag gtc 390

Val	Tyr	Gly	Ala	Glu	Gln	Thr	Ile	His	Val	Gly	Lys	Ser	Gly	Glu	Val	
105						110					115					
acc	tct	tac	tta	gga	gcg	gtg	gtt	act	gag	gat	cag	caa	gct	gaa	gct	438
Thr	Ser	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Thr	Glu	Asp	Gln	Gln	Ala	Glu	Ala	
120					125					130					135	
acg	caa	ggt	aca	act	cca	aaa	atc	agc	gct	tct	gaa	gcg	gtc	tac	act	486
Thr	Gln	Gly	Thr	Thr	Pro	Lys	Ile	Ser	Ala	Ser	Glu	Ala	Val	Tyr	Thr	
				140					145					150		
gca	tat	aaa	gaa	gca	gct	gca	cgg	att	gaa	gcc	ctc	cct	acc	tcc	gac	534
Ala	Tyr	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Arg	Ile	Glu	Ala	Leu	Pro	Thr	Ser	Asp	
			155					160					165			
gat	acg	att	tct	aaa	gat	gtt	gag	gaa	caa	agc	agt	gta	agc	aaa	gac	582
Asp	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Val	Glu	Glu	Gln	Ser	Ser	Val	Ser	Lys	Asp	
		170					175					180				
act	tac	gcc	gaa	gca	gct	aac	aac	gaa	aaa	acg	cta	tct	act	gat	aag	630
Thr	Tyr	Ala	Glu	Ala	Ala	Asn	Asn	Glu	Lys	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp	Lys	
		185				190					195					
gac	gag	ctg	agt	ctt	gat	aaa	gca	tct	gcc	ctg	aaa	gat	agc	aaa	att	678
Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Asp	Lys	Ala	Ser	Ala	Leu	Lys	Asp	Ser	Lys	Ile	
200					205					210					215	
gaa	gcg	gtg	gaa	gca	gaa	aaa	agt	tcc	att	gcc	aaa	atc	gct	aat	ctg	726
Glu	Ala	Val	Glu	Ala	Glu	Lys	Ser	Ser	Ile	Ala	Lys	Ile	Ala	Asn	Leu	
				220					225					230		
cag	cca	gaa	gta	gat	cca	aaa	gcc	gat	ctg	tac	ttc	tat	cct	aaa	ggg	774
Gln	Pro	Glu	Val	Asp	Pro	Lys	Ala	Asp	Leu	Tyr	Phe	Tyr	Pro	Lys	Gly	
			235					240					245			
gat	gac	ctg	cag	ctg	gtt	tat	gta	aca	gaa	gtc	aat	gtt	tta	gaa	cct	822
Asp	Asp	Leu	Gln	Leu	Val	Tyr	Val	Thr	Glu	Val	Asn	Val	Leu	Glu	Pro	
		250					255					260				
gcc	cca	ctg	cgt	act	cgc	tac	att	att	gat	gcc	aat	gat	ggc	agc	atc	870
Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Arg	Tyr	Ile	Ile	Asp	Ala	Asn	Asp	Gly	Ser	Ile	
		265				270					275					
gta	ttc	cag	tat	gac	atc	att	aat	gaa	gcg	aca	ggc	aca	ggt	aaa	ggt	918
Val	Phe	Gln	Tyr	Asp	Ile	Ile	Asn	Glu	Ala	Thr	Gly	Thr	Gly	Lys	Gly	
280					285				290						295	
gtg	ctt	ggt	gat	acc	aaa	tca	ttc	acc	aca	act	gct	tcc	ggc	agt	agc	966
Val	Leu	Gly	Asp	Thr	Lys	Ser	Phe	Thr	Thr	Thr	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	
				300					305					310		
tac	cag	tta	aaa	gat	aca	aca	cgc	ggt	aac	ggg	gtt	gtg	acc	tac	acg	1014
Tyr	Gln	Leu	Lys	Asp	Thr	Thr	Arg	Gly	Asn	Gly	Val	Val	Thr	Tyr	Thr	
			315					320					325			
gcc	tcc	aac	cgt	caa	agc	atc	cca	ggt	acc	att	ctg	acc	gat	gcc	gat	1062
Ala	Ser	Asn	Arg	Gln	Ser	Ile	Pro	Gly	Thr	Ile	Leu	Thr	Asp	Ala	Asp	
		330					335					340				
aat	gta	tgg	aat	gat	cca	gcc	ggc	gtg	gat	gcc	cat	acg	tat	gct	gct	1110
Asn	Val	Trp	Asn	Asp	Pro	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	His	Thr	Tyr	Ala	Ala	
		345				350					355					

ES 2 701 763 T3

aaa aca tat gat tac tat aag gcc aaa ttt gga cgc aac agc att gac Lys Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Ala Lys Phe Gly Arg Asn Ser Ile Asp 360 365 370 375	1158
gga cgc ggg ctg caa ctc cgt tcg aca gtc cat tat ggt agc cgt tac Gly Arg Gly Leu Gln Leu Arg Ser Thr Val His Tyr Gly Ser Arg Tyr 380 385 390	1206
aac aac gcc ttc tgg aat ggc tcc caa atg act tat gga gac ggg gac Asn Asn Ala Phe Trp Asn Gly Ser Gln Met Thr Tyr Gly Asp Gly Asp 395 400 405	1254
ggt agc aca ttt atc gca ttc agc ggg gac ccc gat gtg gta ggt cat Gly Ser Thr Phe Ile Ala Phe Ser Gly Asp Pro Asp Val Val Gly His 410 415 420	1302
gaa ctt acg cac ggt gtc aca gag tat act tcg aat ttg gaa tat tac Glu Leu Thr His Gly Val Thr Glu Tyr Thr Ser Asn Leu Glu Tyr Tyr 425 430 435	1350
gga gag tcc ggt gca ttg aat gag gct ttc tcg gac gtc atc ggt aat Gly Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ala Phe Ser Asp Val Ile Gly Asn 440 445 450 455	1398
gac att cag cgt aaa aat tgg ctt gta ggc gat gat att tat acg cca Asp Ile Gln Arg Lys Asn Trp Leu Val Gly Asp Asp Ile Tyr Thr Pro 460 465 470	1446
aac att gca ggc gat gct ctg cgc tct atg tcc aat cct acc ctg tac Asn Ile Ala Gly Asp Ala Leu Arg Ser Met Ser Asn Pro Thr Leu Tyr 475 480 485	1494
gat caa cca gat cac tat tcc aac ttg tat aca ggc agc tcc gat aac Asp Gln Pro Asp His Tyr Ser Asn Leu Tyr Thr Gly Ser Ser Asp Asn 490 495 500	1542
ggc ggc gtt cat acg aac agc ggt att atc aat aaa gcc tac tat ctg Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile Ile Asn Lys Ala Tyr Tyr Leu 505 510 515	1590
tta gca caa ggt ggt act ttc cat ggc gta act gta aat gga att ggc Leu Ala Gln Gly Gly Thr Phe His Gly Val Thr Val Asn Gly Ile Gly 520 525 530 535	1638
cgc gat gca gcg gtt caa att tac tat agt gcc ttt acg aac tac ctg Arg Asp Ala Ala Val Gln Ile Tyr Tyr Ser Ala Phe Thr Asn Tyr Leu 540 545 550	1686
act tct tct tcc gac ttc tcc aac gca cgc gct gct gtg atc caa gca Thr Ser Ser Ser Asp Phe Ser Asn Ala Arg Ala Ala Val Ile Gln Ala 555 560 565	1734
gca aaa gat cag tac ggt gcg aac tca gca gaa gca act gca gct gcc Ala Lys Asp Gln Tyr Gly Ala Asn Ser Ala Glu Ala Thr Ala Ala Ala 570 575 580	1782
aaa tct ttt gac gct gta ggc gta aac taa atcatataca cgatcctcct Lys Ser Phe Asp Ala Val Gly Val Asn 585 590	1832
cattttctgt ccatagacct ttgccattgt gcaactgtca cttggctctg ccataccagt	1892
cgacgg	1898

ES 2 701 763 T3

<210> 7
 <211> 592
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética

 10 <400> 7
 Met Lys Lys Val Trp Val Ser Leu Leu Gly Gly Ala Met Leu Leu Gly
 1 5 10 15

 Ser Val Ala Ser Gly Ala Ser Ala Glu Ser Ser Val Ser Gly Pro Thr
 20 25 30

 Gln Leu Thr Pro Thr Phe His Ala Glu Gln Trp Lys Ala Pro Ser Ser
 35 40 45

 Val Ser Gly Asp Asp Ile Val Trp Ser Tyr Leu Asn Arg Gln Lys Lys
 50 55 60

 Ser Leu Leu Gly Ala Asp Asp Ser Ser Val Arg Glu Gln Phe Arg Ile
 65 70 75 80

 Val Asp Arg Thr Ser Asp Lys Ser Gly Val Ser His Tyr Arg Leu Lys
 85 90 95

 Gln Tyr Val Asn Gly Ile Pro Val Tyr Gly Ala Glu Gln Thr Ile His
 100 105 110

 Val Gly Lys Ser Gly Glu Val Thr Ser Tyr Leu Gly Ala Val Val Thr
 115 120 125

 Glu Asp Gln Gln Ala Glu Ala Thr Gln Gly Thr Thr Pro Lys Ile Ser
 130 135 140

 Ala Ser Glu Ala Val Tyr Thr Ala Tyr Lys Glu Ala Ala Ala Arg Ile
 145 150 155 160

 Glu Ala Leu Pro Thr Ser Asp Asp Thr Ile Ser Lys Asp Val Glu Glu
 165 170 175

 Gln Ser Ser Val Ser Lys Asp Thr Tyr Ala Glu Ala Ala Asn Asn Glu
 180 185 190

 Lys Thr Leu Ser Thr Asp Lys Asp Glu Leu Ser Leu Asp Lys Ala Ser
 195 200 205

Ala Leu Lys Asp Ser Lys Ile Glu Ala Val Glu Ala Glu Lys Ser Ser
 210 215 220
 Ile Ala Lys Ile Ala Asn Leu Gln Pro Glu Val Asp Pro Lys Ala Asp
 225 230 235 240
 Leu Tyr Phe Tyr Pro Lys Gly Asp Asp Leu Gln Leu Val Tyr Val Thr
 245 250 255
 Glu Val Asn Val Leu Glu Pro Ala Pro Leu Arg Thr Arg Tyr Ile Ile
 260 265 270
 Asp Ala Asn Asp Gly Ser Ile Val Phe Gln Tyr Asp Ile Ile Asn Glu
 275 280 285
 Ala Thr Gly Thr Gly Lys Gly Val Leu Gly Asp Thr Lys Ser Phe Thr
 290 295 300
 Thr Thr Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Lys Asp Thr Thr Arg Gly
 305 310 315 320
 Asn Gly Val Val Thr Tyr Thr Ala Ser Asn Arg Gln Ser Ile Pro Gly
 325 330 335
 Thr Ile Leu Thr Asp Ala Asp Asn Val Trp Asn Asp Pro Ala Gly Val
 340 345 350
 Asp Ala His Thr Tyr Ala Ala Lys Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Ala Lys
 355 360 365
 Phe Gly Arg Asn Ser Ile Asp Gly Arg Gly Leu Gln Leu Arg Ser Thr
 370 375 380
 Val His Tyr Gly Ser Arg Tyr Asn Asn Ala Phe Trp Asn Gly Ser Gln
 385 390 395 400
 Met Thr Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Ser Thr Phe Ile Ala Phe Ser Gly
 405 410 415
 Asp Pro Asp Val Val Gly His Glu Leu Thr His Gly Val Thr Glu Tyr
 420 425 430

ES 2 701 763 T3

Thr Ser Asn Leu Glu Tyr Tyr Gly Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ala
435 440 445

Phe Ser Asp Val Ile Gly Asn Asp Ile Gln Arg Lys Asn Trp Leu Val
450 455 460

Gly Asp Asp Ile Tyr Thr Pro Asn Ile Ala Gly Asp Ala Leu Arg Ser
465 470 475 480

Met Ser Asn Pro Thr Leu Tyr Asp Gln Pro Asp His Tyr Ser Asn Leu
485 490 495

Tyr Thr Gly Ser Ser Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile
500 505 510

Ile Asn Lys Ala Tyr Tyr Leu Leu Ala Gln Gly Gly Thr Phe His Gly
515 520 525

Val Thr Val Asn Gly Ile Gly Arg Asp Ala Ala Val Gln Ile Tyr Tyr
530 535 540

Ser Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Thr Ser Ser Ser Asp Phe Ser Asn Ala
545 550 555 560

Arg Ala Ala Val Ile Gln Ala Ala Lys Asp Gln Tyr Gly Ala Asn Ser
565 570 575

Ala Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Phe Asp Ala Val Gly Val Asn
580 585 590

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir de forma recombinante una proteasa neutra, comprendiendo el procedimiento las etapas de
5 (a) proporcionar en un vector de expresión un ADN con una secuencia que codifica una preproenzima de acuerdo con la SEQ ID NO: 5, y transformar un organismo huésped de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* con el vector de expresión, obteniendo de este modo un organismo huésped transformado; seguido de
10 (b) expresar el ADN en el organismo huésped transformado, en el que el organismo huésped transformado segrega la proteasa neutra; seguido de
(c) aislar la proteasa neutra segregada;
15 produciendo de forma recombinante de este modo la proteasa neutra.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ADN comprende la secuencia de la posición 34 a la posición 1896 de SEQ ID NO: 6.
- 20 3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la etapa (b) comprende cultivar el organismo huésped transformado en un medio líquido, en el que el organismo huésped transformado segrega la proteasa neutra en el medio líquido.
- 25 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la etapa (c) comprende aislar la proteasa neutra segregada del medio líquido.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el organismo huésped carece de una proteasa extracelular seleccionada de Npr y Apr.
- 30 6. Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la posición 289 a la posición 592 de SEQ ID NO: 5, seleccionándose la secuencia de nucleótidos del grupo que consiste en
35 (a) una secuencia de nucleótidos que tiene la secuencia de la posición 898 a la posición 1811 de la SEQ ID NO: 6;
(b) secuencias de nucleótidos derivadas de la secuencia de nucleótidos de la posición 898 a la posición 1811 de la SEQ ID NO: 6 como resultado del código redundante.
- 40 7. La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la secuencia de nucleótidos es la secuencia de la posición 34 a la posición 1811 de ISEQ ID NO: 6.
8. Un vector que contiene una secuencia de nucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7.
- 45 9. Un organismo huésped transformado de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* que contiene al menos un vector de acuerdo con la reivindicación 8.

Fig. 1

```

Seq-1 1  MKKVWFSLLGGAMLLGSVASGASAESSVSGPAQLTPTFHTEQWKAPSSVSGDDIVWSYLN
          MKKVW SLLGGAMLLGSVASGASAESSVSGP QLTPTFH EQWKAPSSVSGDDIVWSYLN
Seq-2 1  MKKVWVFSLLGGAMLLGSVASGASAESSVSGPTQLTPTFHAEQWKAPSSVSGDDIVWSYLN

Seq-1 61  RQKKSLLGVDSSSVREQFRIVDRTSDKSGVSHYRLKQYVNGIPVYGAEQTIHVKGSGEVT
          RQKKSLLG D SSVREQFRIVDRTSDKSGVSHYRLKQYVNGIPVYGAEQTIHVKGSGEVT
Seq-2 61  RQKKSLLGADDSSSVREQFRIVDRTSDKSGVSHYRLKQYVNGIPVYGAEQTIHVKGSGEVT

Seq-1 121 SYLGAVINEDQEEATQGTTPKISASEAVYTAYKEAAARIEALPTSDDTISKDAEPPSSV
          SYLGAV+ EDQQ EATQGTTPKISASEAVYTAYKEAAARIEALPTSDDTISKD EE SSV
Seq-2 121 SYLGAVVTEDQAEATQGTTPKISASEAVYTAYKEAAARIEALPTSDDTISKDVERQSSV

Seq-1 181 SKDTYAEAAANNKTLSDKDELSDLKASVLKDSKIEAVEAEKSSI KIANLQPEVDPKAE
          SKDTYAEAAANN+KTLSDKDELSDLKAS LKDSKIEAVEAEKSSI KIANLQPEVDPKA+
Seq-2 181 SKDTYAEAAANNEKTLSDKDELSDLKASALKDSKIEAVEAEKSSI KIANLQPEVDPKAD

Seq-1 241 LYYYPKGDDLLLVYVTEVNVLEPAPLRTRYIIDANDGSIVFQYDIINEATGTGKGVLGDS
          LY+YYPKGDDL LVYVTEVNVLEPAPLRTRYIIDANDGSIVFQYDIINEATGTGKGVLGD+
Seq-2 241 LYFYPKGDDLQLVYVTEVNVLEPAPLRTRYIIDANDGSIVFQYDIINEATGTGKGVLGDT

Seq-1 301 KSFTTTASGSSYQLKDTTRGNGIVTYTASNRSIPGTLTADADNVWNPAGVDAHAYAAK
          KSFTTTASGSSYQLKDTTRGNG+VITYTASNRSIPGT+LTADADNVWNPAGVDAH YAAK
Seq-2 301 KSFTTTASGSSYQLKDTTRGNGVITYTASNRSIPGTILTADADNVWNPAGVDAHTYAAK

Seq-1 361 TYDYYKSKFGRNSIDGRGLQLRSTVHYGSRYNNAFWNGSQMTYGDGDGSGSTFIAFSGDP
          TYDYYK+KFGRNSIDGRGLQLRSTVHYGSRYNNAFWNGSQMTY GDGDGSGSTFIAFSGDP
Seq-2 361 TYDYYKAKFGRNSIDGRGLQLRSTVHYGSRYNNAFWNGSQMTY--GDGDGSGSTFIAFSGDP

Seq-1 421 DVVGHELTHGVTEYTSNLEYYGESGALNEAFSDVIGNDIQRKNWLVGDDIYTPNICGDAL
          DVVGHELTHGVTEYTSNLEYYGESGALNEAFSDVIGNDIQRKNWLVGDDIYTPNI GDAL
Seq-2 419 DVVGHELTHGVTEYTSNLEYYGESGALNEAFSDVIGNDIQRKNWLVGDDIYTPNIAGDAL

Seq-1 481 RMSNPTLYDQPHHYSNLYKGSSDNGGVHTNSGIINKAYYLLAQGGTFHGVTVNGIGRDA
          RMSNPTLYDQP HYSNLY GSSDNGGVHTNSGIINKAYYLLAQGGTFHGVTVNGIGRDA
Seq-2 479 RMSNPTLYDQPDHYSNLYTGSSDNGGVHTNSGIINKAYYLLAQGGTFHGVTVNGIGRDA

Seq-1 541 AVQIYYSAFTNYLTSSSDFSNARA AVIQAADLYGANS AEATAAAKSFDAVG--
          AVQIYYSAFTNYLTSSSDFSNARA AVIQAAD YGANS AEATAAAKSFDAVG
Seq-2 539 AVQIYYSAFTNYLTSSSDFSNARA AVIQAADQYGANS AEATAAAKSFDAVGVN

```