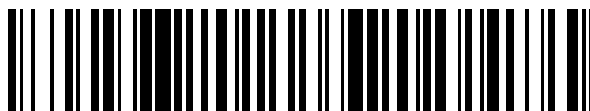


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 402**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 9/52 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2009 E 09827488 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2363461**

54 Título: **Colagenasa de fusión a la que se une una marca de afinidad, y método para producir la misma**

30 Prioridad:

19.11.2008 JP 2008295922

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

13.03.2015

73 Titular/es:

MEIJI SEIKA PHARMA CO., LTD. (50.0%)
4-16, Kyobashi 2-chome Chuo-ku
Tokyo 104-8002, JP y
TOHOKU UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

FUKUSHIMA, TAKAYOSHI;
YOKOYAMA, KENGO;
MURASHIMA, KOICHIRO;
GOTO, MASAFUMI y
YAMAGATA, YOUHEI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 531 402 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

Colagenasa de fusión a la que se une una marca de afinidad, y método para producir la misma

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una colagenasa usada para aislar células (masa celular) de un órgano, tales como células de los islotes pancreáticos de un páncreas.

10 **Antecedentes de la técnica**

Como terapia para la curación para la diabetes, se ha conocido el trasplante de islotes pancreáticos, en el que los islotes pancreáticos (células que producen insulina) aislados de un páncreas tratado con una proteasa se trasplantan en la vena porta de un paciente diabético a través de goteo intravenoso. Este método de trasplante no requiere laparotomía para el paciente durante el trasplante, y por lo tanto recientemente ha atraído la atención como una terapia de curación, que es segura y sencilla, para la diabetes.

Los islotes pancreáticos se aíslan de un páncreas mediante el tratamiento del páncreas con una colagenasa y una metaloproteasa neutra. Como la colagenasa usada para este fin, es particularmente eficaz una colagenasa derivada de *Clostridium histolyticum* (Bibliografías de No Patente 1, 2).

Se ha averiguado que la colagenasa derivada de *Clostridium histolyticum* incluye dos tipos de enzimas que tienen diferente especificidad hacia el sustrato; colagenasa G y colagenasa H (Bibliografías de No Patente 1, 2). Los genes que codifican la colagenasa G y la colagenasa H ya se han aislado, y se ha encontrado que ambas colagenasas son enzimas de dominios múltiples que incluyen un dominio catalítico en el lado del extremo amino y un dominio de unión a colágeno (en lo sucesivo en el presente documento, denominado "CBD") en el lado del extremo carboxilo (Bibliografías de No Patente 1, 2).

Sin embargo, se ha encontrado el problema de que, cuando se produce una colagenasa con *Clostridium histolyticum*, parte de la colagenasa expresada se degrada (Bibliografía de No Patente 2), y el tratamiento de un páncreas con una colagenasa mezclada con la colagenasa degradada disminuye la calidad de los islotes pancreáticos aislados. Por lo tanto, para aislar los islotes pancreáticos, es deseable tratar un páncreas con una colagenasa obtenida retirando tal colagenasa degradada tanto como sea posible a partir del mismo.

Sin embargo, una colagenasa no degradada y una colagenasa degradada son similares en las propiedades fisicoquímicas, y por lo tanto ha sido difícil separar estas colagenasas con métodos tales como cromatografía de intercambio iónico o cromatografía hidrofóbica.

En tales antecedentes, se ha deseado un método para preparar una colagenasa por recogida selectiva de una colagenasa no degradada a partir de colagenasas derivadas de *Clostridium histolyticum*.

Se debería indicar que aún no se ha informado la degradación de una colagenasa derivada de *Clostridium histolyticum* con la colagenasa siendo expresada como una proteína recombinante en un huésped tal como *E. coli*.

45 [Lista de citas]

[Bibliografías de no patente]

50 [NPL 1] Yoshihara, K. *et. al.* Journal of Bacteriology. (1994), 176, 6489-6496
[NPL 2] Matsushita, O. *et. al.* Journal of Bacteriology. (1999), 181, 923-933

Sumario de la invención

55 BIOMOLECULAR NMR ASSIGNMENTS, vol. 2, nº 2, p. 127-129 desvela una proteína de fusión que comprende una colagenasa de *C. histolyticum* y una marca de GST. El dominio de unión a colágeno C-terminal de la colagenasa está condensado con el extremo C de la marca de GST. APL MICROBIOL BIOTECHNOL (2008) 19: 627-635 describe una colagenasa de fusión en la que una marca de afinidad que contiene seis Histidinas se une a los extremos carboxilo de la colagenasa expresada en *Clostridium perfringens*.

60 **Problema técnico**

La presente invención tiene como objetivo la recogida de forma selectiva de una colagenasa no degradada por retirada de una colagenasa degradada de colagenasas derivadas de *Clostridium histolyticum*.

65

Solución al problema

Con respecto a las colagenasas derivadas de *Clostridium histolyticum*, los presentes inventores prepararon colagenasas de fusión en las que marcas de afinidad unidas a los extremos carboxilo de las colagenasas se expresaban como proteínas recombinantes. Cuando una colagenasa derivada de *Clostridium histolyticum* se expresa como una proteína recombinante en un huésped tal como *E. coli*, no se ha predicho bien si la proteína recombinante se degrada por la acción de una proteasa en un huésped o no, ni cómo se degrada la proteína recombinante suponiendo que se degrade. Sin embargo, los presentes inventores purificaron la proteína expresada en un huésped con una columna de afinidad, y encontraron de forma accidental que se retiraba una colagenasa degradada y que se recogía de forma selectiva una sola colagenasa que tenía una actividad de colagenasa. Esto se basa en las siguientes suposiciones: una colagenasa derivada de *Clostridium histolyticum* expresada en un huésped se degradó en el CBD en las cercanías de la marca de afinidad fusionada, y por lo tanto la degradación del CBD permitió que la marca de afinidad se separara de la colagenasa; y en la etapa de purificación por cromatografía por afinidad, la colagenasa degradada no se adsorbía a la columna de afinidad sino que solo se adsorbía una colagenasa no degradada a la columna de afinidad.

En otras palabras, los presentes inventores encontraron que si una marca de afinidad se une a una colagenasa en una configuración específica, una sola colagenasa que tiene una actividad de colagenasa se puede recoger de forma selectiva en el proceso de purificación por afinidad sin que se adsorba la colagenasa degradada en un huésped. Este descubrimiento ha llevado a los inventores a la finalización de la presente invención.

La presente invención se refiere a un método para producir una colagenasa de fusión, en el que:

un cultivo obtenido mediante el cultivo de *E. coli* transformada por uno cualquiera de un ADN que codifica la colagenasa de fusión y un vector de expresión que comprende el ADN se purifica mediante cromatografía por afinidad que corresponde a una marca de afinidad para recoger de ese modo de forma selectiva la colagenasa de fusión que tiene un dominio de unión a colágeno, en el que la colagenasa de fusión tiene las siguientes características (i) a (ii):

- (i) la marca de afinidad se une directa o indirectamente a un extremo carboxilo de la colagenasa;
(ii) la colagenasa se selecciona entre los siguientes (a) a (h):

- (a) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a 1008 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2;
(b) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a 1008 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2 en la que se suprimen, sustituyen, insertan, o añaden de 1 a 30 aminoácidos;
(c) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de un 80 % o superior con la secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a 1008 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2;
(d) una colagenasa en la que una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a -1 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2 se retira de una cualquiera de las colagenasas que se han descrito en (a) a (c);
(e) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a 981 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6;
(f) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a 981 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6 en la que se suprimen, sustituyen, insertan, o añaden de 1 a 30 aminoácidos;
(g) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de un 80 % o superior con la secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a 981 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6;
(h) una colagenasa en la que una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a -1 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6 se retira de una cualquiera de las colagenasas que se han descrito en (e) a (g).

La colagenasa de fusión de acuerdo con la invención, en la que la marca de afinidad se une directa o indirectamente a un extremo carboxilo de la colagenasa.

La colagenasa de fusión de acuerdo con la invención, en la que la marca de afinidad es dos o más restos de histidina consecutivos.

La colagenasa de fusión de acuerdo con la invención, en la que la colagenasa se deriva de *Clostridium histolyticum*.

La colagenasa de fusión de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a 1021 de la SEC ID N^o: 3. En particular, a partir de la colagenasa de fusión que se ha mencionado anteriormente se retira una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a -1 de la SEC ID N^o: 3.

La colagenasa de fusión de acuerdo con la invención, comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a 994 de la SEC ID N°: 7. En particular, a partir de la colagenasa de fusión que se ha mencionado anteriormente se retira una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a -1 de la SEC ID N°: 7.

5 En el presente documento se describe un ADN que codifica la colagenasa de fusión de acuerdo con la invención.

En el presente documento se describe un ADN que comprende una secuencia de bases de las posiciones 1 a 3396 de la SEC ID N°: 4.

10 En el presente documento se describe un ADN que comprende una secuencia de bases de las posiciones 1 a 3105 de la SEC ID N°: 8.

En el presente documento se describe un vector de expresión que comprende el ADN que se ha mencionado anteriormente.

15 Además, en el presente documento se describe una célula huésped transformada con uno cualquiera del ADN y el vector de expresión que se han mencionado anteriormente. La célula huésped es *E. coli*.

20 En el presente documento se describe una colagenasa de fusión producida con el método de acuerdo con la invención.

Efecto ventajoso de la invención

25 La presente invención proporciona una colagenasa de fusión en la que se une una marca de afinidad a una colagenasa derivada de *Clostridium histolyticum*, en la que la colagenasa y la marca de afinidad se unen entre sí de tal modo que un fragmento que tiene una actividad de colagenasa y la marca de afinidad se separan entre sí cuando la colagenasa de fusión expresada en un huésped se degrada por acción del huésped.

30 La presente invención también proporciona un ADN necesario para producir la colagenasa de fusión como una proteína recombinante de forma eficaz, y una célula huésped que expresa la colagenasa de fusión como una proteína recombinante. Además, la presente invención proporciona un método capaz de recoger de forma selectiva una sola colagenasa de fusión que tiene un CBD por retirada de una colagenasa en la que partió todo de un CBD se degrada a partir de una solución de cultivo obtenida por cultivo de una célula huésped que expresa la colagenasa de fusión. La presente invención conduce a una producción eficaz de una colagenasa de fusión que tiene un CBD.

35 **Breve descripción de las figuras**

[Fig. 1] La Figura 1 es una figura que muestra una estructura de un pColG plásmido. En la figura, los significados de los símbolos son tal como sigue a continuación (en la figura se subrayan los tipos oblicuos). colG: un gen de colagenasa G, PlacZ: un promotor de lacZ, y Amp^r: un gen de resistencia a la ampicilina.

[Fig. 2] La Figura 2 es una figura que muestra una estructura de un pColG-His plásmido. En la figura, los significados de los símbolos son tal como sigue a continuación (en la figura se subrayan los tipos oblicuos). colG: un gen de colagenasa G, PlacZ: un promotor de lacZ, Amp^r: un gen de resistencia a la ampicilina, MCS: un sitio de clonación múltiple, y 6XHis: una marca de histidina.

45 [Fig. 3] La Figura 3 es una imagen de electroforesis que muestra el resultado de la actividad de tinción realizada en un extracto de *E. coli* que tiene colagenasa G de fusión expresada.

[Fig. 4] La Figura 4 es una imagen de electroforesis que muestra el resultado de la actividad de tinción realizada en una solución de colagenasa G de fusión sometida a cromatografía por afinidad.

50 [Fig. 5] La Figura 5 es una figura que muestra una estructura de un plásmido pColH. En la figura, los significados de los símbolos son tal como sigue a continuación (en la figura se subrayan los tipos oblicuos). colH: un gen de colagenasa H, PlacZ: un promotor de lacZ, y Amp^r: un gen de resistencia a la ampicilina.

[Fig. 6] La Figura 6 es una figura que muestra una estructura de un plásmido pColH-His. En la figura, los significados de los símbolos son tal como sigue a continuación (en la figura se subrayan los tipos oblicuos). colH: un gen de colagenasa H, PlacZ: un promotor de lacZ, Amp^r: un gen de resistencia a la ampicilina, MCS: un sitio de clonación múltiple, y 6XHis: una marca de histidina.

[Fig. 7] La Figura 7 es una imagen de electroforesis que muestra el resultado de la actividad de tinción realizada en un extracto de *E. coli* que tiene colagenasa H de fusión expresada.

[Fig. 8] La Figura 8 es una imagen de electroforesis que muestra el resultado de la actividad de tinción realizada en una solución de colagenasa H de fusión sometida a cromatografía por afinidad.

60 **Descripción de realizaciones**

(Colagenasa de fusión)

65 En la presente invención, una colagenasa de fusión se refiere a una proteína en la que una marca de afinidad se une directa o indirectamente a una colagenasa, es decir una colagenasa de fusión en la que la colagenasa y la marca de

afinidad se unen entre sí de tal modo que un fragmento que tiene una actividad de colagenasa y la marca de afinidad en la colagenasa de fusión se separan entre sí cuando la colagenasa de fusión expresada en un huésped se degrada por una acción de huésped. La forma de unión de tal colagenasa a la marca de afinidad es una unión preferentemente a un CBD de la colagenasa, y lo más preferentemente una unión al extremo carboxilo del CBD (es decir el extremo carboxilo de la colagenasa). En la presente invención, el "CBD" se refiere a regiones de los segmentos 3a y 3b en la colagenasa G (posición 776 del extremo carboxilo de cada una de las SEC ID N^o: 1 y 2), y una región de un segmento 3 en la colagenasa H (de la posición 864 al extremo carboxilo de la SEC ID N^o: 5) (Bibliografía de No Patente 2).

En la presente invención, como una colagenasa se puede usar cualquier colagenasa siempre y cuando se puedan aislar islotes pancreáticos de un páncreas al tratarlos en combinación con una metaloproteasa neutra. De forma particular, se desea el uso de una colagenasa derivada de *Clostridium histolyticum*. Se puede usar cualquier colagenasa derivada de *Clostridium histolyticum*, pero se desea en particular el uso de la colagenasa G de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2, o la colagenasa H de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6. Además, tal colagenasa puede incluir una secuencia de aminoácidos que tiene retirada toda o parte de una secuencia de señal.

Aquí, la secuencia de aminoácidos de la colagenasa G puede ser cualquiera de las siguientes siempre y cuando se mantengan la actividad de colagenasa y la unión al colágeno: (i) una colagenasa que comprende toda o parte de una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a 1008 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2; (ii) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a 1008 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2 en la que se suprimen, sustituyen, insertan, añaden uno o más aminoácidos; (iii) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de un 70 % o superior con la secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a 1008 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2; y (iv) una colagenasa en la que toda o parte de una secuencia de señal que incluye una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a -1 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2 se retira a partir de una de las colagenasas que se describen en (i) a (iii).

De forma análoga, la secuencia de aminoácidos de la colagenasa H puede ser cualquiera de las siguientes siempre y cuando se mantengan la actividad de colagenasa y la unión al colágeno: (i) una colagenasa que comprende toda o parte de una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a 981 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6; (ii) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a 981 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6 en la que se suprimen, sustituyen, insertan, añaden uno o más aminoácidos; (iii) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de un 70 % o superior con la secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a 981 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6; y (iv) una colagenasa en la que toda o parte de una secuencia de señal que incluye una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a -1 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6 se retira a partir de una de las colagenasas que se describen en (i) a (iii).

Aquí, la "secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, sustituyen, insertan, añaden uno o más aminoácidos" se refiere a que la secuencia de aminoácidos se modifica con métodos bien conocidos tales como mutagénesis dirigida al sitio, o sustitución o similares de aminoácidos con el mismo número de aminoácidos sustituidos de forma natural. El número de modificación de los aminoácidos es preferentemente de 1 a 50, más preferentemente 1 a 30, además preferentemente de 1 a 10, aún además preferentemente de 1 a 5, y lo más preferentemente de 1 a 2. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos modificada puede ser preferentemente una secuencia de aminoácidos que tiene una o más sustituciones conservadoras (preferentemente, de 1 a varias, o 1, 2, 3 o 4) de aminoácidos de la misma. Aquí, la "sustitución conservadora" se refiere a que al menos un resto de aminoácido está sustituido con otro resto de aminoácido químicamente similar. Los ejemplos incluyen un caso en el que un determinado resto hidrófobo está sustituido con otro resto hidrófobo, un caso en el que un determinado resto polar está sustituido con otro resto polar que tiene la misma carga, otros casos. En la técnica se conocen aminoácidos funcionalmente similares que se pueden someter a tal sustitución para cada aminoácido. Los ejemplos específicos de aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, triptófano, fenilalanina, metionina, etc. los ejemplos específicos de aminoácidos polares (neutros) incluyen glicina, serina, treonina, tirosina, glutamina, asparagina, cisteína, etc. los ejemplos específicos de aminoácidos cargados de forma positiva (básicos) incluyen arginina, histidina, lisina, etc. Además, los ejemplos específicos de aminoácidos cargados de forma negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, etc.

Además, la "secuencia de aminoácidos que tiene una homología de un 70 % o superior" puede ser una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de, preferentemente un 80 % o superior, más preferentemente un 85 % o superior, además preferentemente un 90 % o superior, aún además preferentemente un 95 % o superior, de forma particularmente preferente un 98 % o superior, y lo más preferentemente un 99 % o superior. El término "homología" con respecto a la secuencia de bases o a la secuencia de aminoácidos se usa como un significado del grado de correspondencia, entre secuencias a comparar, en restos de bases o aminoácidos que constituyen cada secuencia. Cada uno de los valores numéricos de la "homología" que se describe en la presente descripción puede ser cualquier valor numérico calculado usando un programa de búsqueda de homología conocido por los expertos en la materia, y se puede calcular fácilmente usando los parámetros por defecto (ajuste inicial) en FASTA, BLAST, etc., por ejemplo.

En la presente invención, como la marca de afinidad a fusionar directa o indirectamente a la colagenasa, se puede usar cualquier marca de afinidad siempre y cuando se pueda unir de forma selectiva a un determinado tipo de vehículo. Por ejemplo, se puede usar una marca de histidina que incluye dos o más restos de histidina consecutivos que se unen de forma selectiva a una columna de quelato de níquel que se describe en la Patente Japonesa N° 2686090, un dominio de unión a celulosa que se une de forma selectiva a una celulosa insoluble, un dominio de unión a maltosa que se une de forma selectiva a una resina de unión a maltosa, y similares. De forma particular, se desea el uso de la marca de histidina que tiene un peso molecular menor.

En la presente invención, la marca de afinidad se une directa o indirectamente a la colagenasa. Aquí, cuando la colagenasa y la marca de afinidad se unen indirectamente entre sí, la secuencia de aminoácidos que interviene entre ellas puede ser cualquier secuencia siempre y cuando no inhiba materialmente la actividad de la colagenasa de fusión y la unión al colágeno.

Los ejemplos de la colagenasa de fusión que satisface los requisitos anteriores incluyen una colagenasa de fusión que comprende toda una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 en la que la marca de histidina se une al extremo carboxilo de la colagenasa G, y una colagenasa de fusión que comprende toda una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7 en la que la marca de histidina se une al extremo carboxilo de la colagenasa H. Además, los ejemplos incluyen una colagenasa de fusión que comprende parte de tal secuencia de aminoácidos siempre y cuando se mantenga la actividad de colagenasa, la unión al colágeno, y la unión a la marca de afinidad.

(Secuencia de aminoácidos que codifica un ADN de colagenasa de fusión)

En la presente invención, un ADN que codifica la colagenasa de fusión puede ser un ADN que comprende cualquier secuencia de bases siempre y cuando el ADN codifique la secuencia de aminoácidos de la colagenasa de fusión que se ha descrito anteriormente.

El ADN que codifica la colagenasa de fusión de la presente invención se puede obtener por síntesis química artificial. Además, el ADN que codifica la colagenasa de fusión se puede obtener por construcción de un ADN que codifica la colagenasa y un ADN que codifica la marca de afinidad de forma separada y uniéndolos en conjunto. En este caso, el gen de la colagenasa se puede amplificar por PCR usando un cebador sintetizado basándose en la secuencia del gen y con un molde de un ADN, tal como ADN genómico, ADNc, y plásmido, que incluye el gen. Por ejemplo, la colagenasa G o la colagenasa H derivadas de *Clostridium histolyticum* se pueden amplificar por PCR usando un cebador diseñado basándose en la secuencia del extremo en la posición 5' y el extremo en la posición 3' de la secuencia del gen de la colagenasa G que se describe en la Bibliografía de No Patente 1 o el gen de la colagenasa H que se describe en la Bibliografía de No Patente 2 y con un molde de un ADN genómico derivado de *Clostridium histolyticum*. Además, el ADN que codifica la marca de afinidad se puede amplificar por PCR con un molde de ADN genómico, ADNc, plásmido, o similar que incluye el gen que codifica la marca de afinidad. Por ejemplo, un ADN que codifica la marca de histidina se puede amplificar por PCR con un molde de pET-24a(+), un vector disponible en el mercado.

Los ejemplos del ADN que satisface los requisitos mencionados anteriormente incluyen un ADN que comprende toda o parte de la secuencia de bases de la SEC ID N°: 4 que codifica la colagenasa de fusión en la que la marca de histidina se une al extremo carboxilo de la colagenasa G; y un ADN que comprende toda o parte de la secuencia de bases de la SEC ID N°: 8 para unir la marca de histidina al extremo carboxilo de la colagenasa H.

(Vector de expresión, y célula huésped transformada por el vector de expresión)

La presente invención proporciona un vector de expresión que comprende el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la colagenasa de fusión que se ha descrito anteriormente, que es capaz de replicar el ADN en una célula huésped, y que comprende una proteína codificada por la secuencia de ADN en un estado de expresión. El presente vector de expresión se puede construir basándose en un vector de autorreplicación, es decir, por ejemplo, un plásmido que existe en forma de un elemento extracromosómico independiente y que se replica independientemente de la replicación del cromosoma. Además, el presente vector de expresión puede ser cualquier vector que se introduce en una célula huésped, a continuación se incorpora en el genoma de la célula huésped, y se replica junto con el cromosoma incorporado con el mismo. Como un procedimiento y un método para construir el vector de acuerdo con la presente invención, se puede usar cualquier procedimiento y cualquier método usado habitualmente en el campo de la ingeniería genética.

El vector de expresión de acuerdo con la presente invención, para expresar la colagenasa de fusión cuando el vector de expresión se introduce realmente en la célula huésped, comprende de forma deseable, además del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la colagenasa de fusión que se ha descrito anteriormente, una secuencia de ADN para regular la expresión del ADN, un marcador genético para seleccionar la célula huésped transformada, y similares. La secuencia de ADN para regular la expresión incluye una secuencia de ADN que codifica un promotor, terminador, un péptido de señal, y similares. El promotor no se limita de forma en particular siempre y cuando presente la actividad de transcripción en una célula huésped, y se pueda obtener como la secuencia de ADN para regular la expresión del gen que codifica una proteína homogénea o heterogénea con respecto a la célula huésped.

Además, el péptido de señal no se limita de forma en particular siempre y cuando contribuya a la secreción de la proteína en la célula huésped, y se pueda obtener a partir de la secuencia de ADN derivada del gen que codifica una proteína homogénea o heterogénea con respecto a la célula huésped. Además, en la presente invención el marcador genético se puede seleccionar de forma apropiada dependiendo del método para seleccionar el transformante, y se puede usar, por ejemplo, un gen que codifica la resistencia al fármaco y un gen que complementa la auxotrofia.

Además, de acuerdo con la presente invención, se proporciona una célula huésped transformada por este vector de expresión. Este sistema de huésped-vector no se limita de forma particular, y se puede usar un sistema que usa, por ejemplo, *E. coli*, actinomiceto, levadura, hongo filamentoso, célula animal, etc., o similares. De forma particular, como huésped se usa de forma deseable *E. coli*.

Además, la célula huésped se puede transformar con tales vectores de expresión de acuerdo con métodos usados habitualmente en la técnica.

(Cultivo de célula huésped que expresa colagenasa de fusión, y recogida selectiva de colagenasa de fusión que tiene CBD mediante cromatografía por afinidad)

En la presente invención, la colagenasa de fusión se puede obtener a partir de un cultivo que se obtiene mediante el cultivo de la célula huésped que expresa la colagenasa de fusión se puede cultivar en un medio adecuado. El cultivo y su condición para la célula huésped que expresa la colagenasa de fusión pueden ser básicamente los mismos y éstos se usan para la célula huésped.

La colagenasa de fusión secretada en la célula huésped que expresa la colagenasa de fusión o en la solución de cultivo se puede recoger adoptando métodos usados habitualmente en la técnica.

La colagenasa de fusión recogida de acuerdo con el método anterior se somete a cromatografía por afinidad para retirar una colagenasa degradada, recogiendo de ese modo de forma selectiva la colagenasa de fusión que tiene el CBD. Es necesario que la cromatografía por afinidad usada en este caso sea un método que corresponda a la marca de afinidad unida a la colagenasa. Por ejemplo, cuando la marca de histidina se une a la colagenasa, se usa una columna de quelato de níquel o similar a la que la marca de histidina se une de forma selectiva para purificación.

La extensión hasta la que se retira una colagenasa degradada mediante cromatografía por afinidad se puede evaluar sometiendo la solución de colagenasa de fusión a electroforesis usando gel con gelatina añadida al mismo y a continuación la actividad de tinción.

(Otros aspectos)

De acuerdo con el conocimiento de los presentes inventores acerca de que la expresión una colagenasa recombinante por *E. coli* o similar hace que parte o todo su CBD se degrade, la colagenasa degradada se puede eliminar y una colagenasa recombinante no degradada se puede purificar por afinidad de forma específica usando un anticuerpo que se une al CBD de la colagenasa recombinante. En este caso, es ventajoso en que no es necesario que la marca de afinidad se fusione con la colagenasa recombinante. De forma específica, la presente invención también proporciona un método para producir una colagenasa, caracterizado por que un cultivo obtenido mediante el cultivo de una célula huésped que tiene una colagenasa recombinante expresada se purifica con un anticuerpo que se une a un CBD de la colagenasa recombinante para recoger de ese modo de forma selectiva una colagenasa que tiene el CBD. Además, dado que el CBD y el colágeno tienen una afinidad entre sí, la colagenasa recombinante se puede purificar por afinidad de forma específica usando colágeno en lugar del anticuerpo que se ha descrito anteriormente. De forma específica, la presente invención también proporciona un método para producir una colagenasa, en el que un cultivo obtenido mediante el cultivo de una célula huésped que tiene una colagenasa recombinante expresada se purifica con colágeno para recoger de ese modo de forma selectiva una colagenasa que tiene el CBD.

Ejemplos

La presente invención se describirá de forma más específica por medio de de Ejemplos, pero la presente invención no se va a limitar a los Ejemplos que siguen a continuación pero aún están dentro del punto esencial de la presente invención.

[Ejemplo 1] Expresión de colagenasa de fusión (colagenasa G de fusión) en la que se une marca de histidina a extremo carboxilo de la colagenasa G derivada de *Clostridium histolyticum*

(1-1) Preparación de fragmento de gen de colagenasa G

Se amplificó un gen de colagenasa G derivado de *Clostridium histolyticum* desde el extremo en la posición 5' al extremo la posición 3' del mismo mediante PCR con un molde de ADN genómico derivado de *Clostridium*

histolyticum. En este caso, los cebadores se diseñaron de modo que el extremo la posición 3' del gen amplificado de la colagenasa G sirvieran como una secuencia de reconocimiento de XbaI y adicionalmente se añadió una secuencia de reconocimiento de BamHI posteriormente al codón de parada del gen. Como resultado, se introdujeron mutaciones en la secuencia de aminoácidos en dos posiciones (aminoácidos en las posiciones 1007 y 1008 de la SEC ID N°: 1) en el plato del extremo carboxilo de la colagenasa G natural que se describe en la Bibliografía de No Patente 1. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos se modificó a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.

Los cebadores usados en esta PCR fueron los que siguen a continuación .

10 colG-F:
ATGAAAAAAAAATATTTTAAAGATTC (SEC ID N°: 9)
colG-R:
CCGGATCCTATCTAGATACCCTTAACT (SEC ID N°: 10)

15 El fragmento amplificado del gen de la colagenasa G se digirió con BamHI.

(1-2) Preparación de fragmento de ADN que incluye la región que codifica marca de histidina

20 Para preparar un ADN que codifica la marca de histidina que incluye seis restos de histidina consecutivos, el ADN que codifica la marca de histidina se amplificó mediante PCR con un molde de pET-24a(+), un vector disponible en el mercado. En el fragmento de ADN, además del ADN que codifica la marca de histidina, se incluyeron un sitio de clonación múltiple originado a partir del vector y un fragmento de gen que corresponde a un terminador T7. Los cebadores se diseñaron para que incluyeran la secuencia de reconocimiento de XbaI en el extremo en la posición 5' del fragmento de ADN amplificado y la secuencia de reconocimiento de BamHI en el extremo en la posición 3' del mismo.

Los cebadores usados en esta PCR fueron los que siguen a continuación.

30 His-F:
GCTCTAGAAAGCTTGCGGCCGCACTCGA (SEC ID N°: 11)
His-R:
CGGGATCCGGATATAGTTCCTCCT (SEC ID N°: 12)

35 El fragmento de ADN amplificado que incluye la región que codifica la marca de histidina se digirió doblemente con XbaI y BamHI.

(1-3) Preparación de fragmento de promotor lacZ

40 Un promotor lacZ se preparó como un promotor para expresar la colagenasa de fusión. El fragmento de ADN se amplificó mediante PCR con un molde de pUC19. En este caso, los cebadores se diseñaron para que incluyeran una secuencia de reconocimiento de HindIII en el extremo en la posición 5' del fragmento de ADN amplificado.

Los cebadores usados en esta PCR fueron los que siguen a continuación.

45 lac-F:
CCGGCAAGCTTGCCCAATACGCAAACCG (SEC ID N°: 13)
lac-R:
AGCTGTTTCCTGTGTGAA (SEC ID N°: 14)

50 El fragmento del promotor lacZ amplificado se digirió con HindIII.

(1-4) Construcción de vector de expresión para la colagenasa G de fusión a la que se une una marca de histidina

55 Se insertaron tres tipos de fragmentos de ADN preparados con el método que se ha descrito anteriormente en pBR322, un vector disponible en el mercado, con el fin de unirlos en el orden del promotor lacZ, el gen de la colagenasa G, y el fragmento de ADN que incluye la marca de histidina del extremo en la posición 5'. En primer lugar, el promotor lacZ y el gen de la colagenasa G se insertaron en pBR322. De forma específica, la región del promotor lacZ y el fragmento de gen de la colagenasa G preparado tal como se ha descrito anteriormente se fosforilaron, y a continuación se insertaron en pBR322 que se había digerido doblemente con HindIII y BamHI para construir pColG (Fig. 1). Se debe indicar que la región del promotor del gen lacZ (PlacZ) y el gen de colG se unieron entre sí en sus extremos truncados. Posteriormente, el ADN que codifica la marca de histidina preparado con el método que se ha descrito anteriormente se insertó en pColG que se había digerido doblemente con XbaI y BamHI para construir pColG-His (Fig. 2). El ADN que se insertó por último en pBR322 fue un ADN que tenía la secuencia de bases de las posiciones 1 a 3396 del Listado de Secuencias: 4.

65

(1-5) Preparación de *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión

pColG-His se transformó en *E. coli*, cepa χ 1776 de *Escherichia coli*, de acuerdo con el método convencional, y se cultivó a 37 °C durante todo un día en agar LB al que se habían añadido 20 µg/ml de ácido diaminopimélico, 100 µg/ml de timidina, y 50 µg/ml de ampicilina. Por lo tanto, se preparó la *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión.

[Ejemplo 2] Cultivo de *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión, y recogida selectiva de la colagenasa G que tiene CBD

(2-1) Cultivo de *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión

La *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión obtenida en el Ejemplo 1 se inoculó en un matraz de Erlenmeyer 250 ml añadiendo 100 ml de un medio, y se cultivó con agitación a 200 rpm a 28 °C durante 16 horas. El medio usado en este cultivo era un medio de TB (triptona al 1,2 %, extracto de levadura al 2,4 %, hidrogenofosfato dipotásico al 0,94 %, dihidrogenofosfato potásico al 0,22 %, glicerol al 0,8 %) al que se añadieron 100 µg/ml de ácido diaminopimélico, 20 µg/ml de timidina, 50 µg/ml de ampicilina, y 0,1 mM de IPTG.

(2-2) Preparación de extracto de *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión

La solución de cultivo resultante obtenida en (2-1) se sometió a centrifugación para recoger células, seguido de lisis de las células recogidas en 10 ml de Reactivo de cultivo POP (fabricado por Merck & Co., Inc.) para extraer una proteína en las células. El sobrenadante obtenido por centrifugación del lisado se filtró con una membrana de 0,2 µm para retirar un gen recombinante, proporcionando de ese modo un extracto de la *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión.

(2-3) Recogida selectiva de la colagenasa G de fusión que tiene CBD mediante cromatografía por afinidad

Para retirar una colagenasa degradada del extracto de *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión obtenida en (2-2), el extracto se fraccionó con una columna de quelato de níquel que se sometió a cromatografía por afinidad para la marca de histidina. A 10 ml del extracto de la *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión preparada con el método que se ha descrito anteriormente, se añadieron 60 ml de un tampón (tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 7,5) al que se añadieron NaCl 0,5 M e imidazol 20 mM) para unión a la columna de quelato de níquel. La mezcla se pasó a través de una columna de quelato de níquel de 100 ml equilibrada con un tampón para la unión a la columna de quelato de níquel. A continuación, la columna se lavó con una cantidad adecuada de un tampón para la unión a la columna de quelato de níquel para retirar una colagenasa degradada que no había sido capaz de ser adsorbida a la columna de quelato de níquel. A partir de ese momento, se pasaron a través de la columna 100 ml de un tampón para unión a la columna de quelato de níquel a la que se había añadido imidazol 500 mM. Por lo tanto, se recogió la colagenasa G de fusión que tenía el CBD.

(2-4) Confirmación de retirada de colagenasa degradada

Para confirmar que la colagenasa degradada se retiró del extracto de la colagenasa G de fusión, la actividad de tinción se realizó en el extracto de la *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión y la solución de la colagenasa G de fusión se sometió a la cromatografía por afinidad. La actividad de tinción se realizó en 0,25 µl del extracto de la *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión obtenida en (2-2) y 2,5 µl de la solución de la colagenasa G de fusión sometida a la cromatografía por afinidad obtenida en (2-3) con Zymogram-PAGE mini (fabricado por TEFCO). Como resultado, se observaron cinco bandas que indicaban actividad de proteasa para el extracto de la *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión (Fig. 3). Por otro lado, para la solución de la colagenasa G de fusión sometida a la cromatografía por afinidad, se observó una banda que indicaba el peso molecular máximo como una banda principal entre las cinco bandas mencionadas anteriormente (Fig. 4). Basándose en la comparación y el análisis de estas bandas, se encontró que parte o todo el CBD se degradaba cuando la colagenasa G de fusión se expresaba por *E. coli*. Los resultados anteriores mostraron que la colagenasa de fusión que tenía el CBD se recogió de forma selectiva satisfactoriamente purificando el extracto de la *E. coli* que expresa la colagenasa G de fusión mediante la cromatografía por afinidad y retirando de ese modo la colagenasa en la que se degradó parte o todo el CBD.

[Ejemplo 3] Expresión de colagenasa de fusión en la que se une una marca de histidina a extremo de carboxilo de la colagenasa H derivada de *Clostridium histolyticum*

(3-1) Preparación de fragmento de gen de colagenasa H

Se amplificó un gen de la colagenasa H derivado de *Clostridium histolyticum* desde el extremo en la posición 5' al extremo en la posición 3' del mismo por PCR con un molde de ADN genómico derivado de *Clostridium histolyticum*. En este caso, los cebadores se diseñaron de modo que el extremo en la posición 3' del gen de la colagenasa H amplificada servían como una secuencia de reconocimiento de *Xba*I y adicionalmente se añadió una secuencia de reconocimiento de *Bam*HI después del codón de parada del gen. Como resultado, se introdujo una mutación en la secuencia de aminoácidos en una posición (un aminoácido en la posición 980 de la SEC ID N°: 5) en el lado del

extremo carboxilo de la secuencia de aminoácidos de la colagenasa H natural que se describe en la Bibliografía de No Patente 2. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos se modificó a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6.

5 Los cebadores usados en esta PCR fueron los que siguen a continuación.

colH-F:
ATGAAAAGGAAATGTTTATC (SEC ID N°: 15)

10 colH-R:
CCGGATCCTATCTAGATACTGAACCTT (SEC ID N°: 16)

El fragmento del gen de la colagenasa H amplificada se digirió con BamHI.

(3-2) Preparación de fragmento de ADN que incluye región que codifica marca de histidina

15 Se preparó un fragmento de ADN que incluye la región que codifica la marca de histidina con el mismo método que en el Ejemplo 1.

(3-3) Preparación del fragmento del promotor lacZ

20 Se preparó un fragmento del promotor lacZ con el mismo método que en el Ejemplo 1.

(3-4) Construcción de vector de expresión para colagenasa H de fusión a la que se une una marca de histidina

25 Se insertaron tres tipos de fragmentos de ADN preparados con el método que se ha descrito anteriormente en pBR322, un vector disponible en el mercado, con el fin de unirlos en el orden de promotor lacZ, el gen de la colagenasa H, y el fragmento de ADN que incluye la marca de histidina desde el extremo en la posición 5'. En primer lugar, para insertar el promotor lacZ y el gen de la colagenasa H en pBR322, la región del promotor lacZ y el fragmento del gen de la colagenasa H preparado tal como se ha descrito anteriormente se fosforilaron, y a continuación se insertaron en pBR322 que se había digerido doblemente con HindIII y BamHI para construir pColH (Fig. 5). Se debe indicar que la región del promotor del gen lacZ y el gen de la colagenasa H se unieron entre sí en sus extremos truncados. Posteriormente, el fragmento de ADN que incluía el ADN que codifica la marca de histidina preparada con el método que se ha descrito anteriormente se insertó en pColH que se había digerido doblemente con XbaI y BamHI para construir pColH-His (Fig. 6). El ADN que se había insertado por último en pBR322 era un ADN que tenía la secuencia de bases de las posiciones 1 a 3105 del Listado de Secuencias: 8.

(3-5) Preparación de *E. coli* que expresa la colagenasa H de fusión

La *E. coli* que expresa la colagenasa H de fusión se creó con el mismo método que en el Ejemplo 1.

40 [Ejemplo 4] Cultivo de *E. coli* que expresa la colagenasa H de fusión, y recogida selectiva de la colagenasa H que tiene CBD

(4-1) Cultivo de *E. coli* que expresa la colagenasa H de fusión

45 La *E. coli* que expresa la colagenasa H de fusión obtenida en el Ejemplo 3 se cultivó con el método que se ha descrito en el Ejemplo 2 para obtener una solución de cultivo.

(4-2) Preparación de extracto de *E. coli* que expresa la colagenasa H de fusión

50 Se obtuvo un extracto de la *E. coli* que expresa la colagenasa H de fusión a partir de la solución de cultivo resultante obtenida en (4-1) con el método que se ha descrito en el Ejemplo 2.

(4-3) Recogida selectiva de la colagenasa H de fusión que tiene CBD mediante cromatografía por afinidad

55 El extracto de la *E. coli* que expresa la colagenasa H de fusión obtenida en (4-2) se sometió a cromatografía por afinidad con el método que se ha descrito en el Ejemplo 2 para recoger de este modo la colagenasa H de fusión que tiene el CBD.

(4-4) Confirmación de retirada de colagenasa degradada

60 Para confirmar en qué medida se retiró la colagenasa degradada a partir de la colagenasa H de fusión, la actividad de tinción se realizó después de electroforesis con el método que se ha descrito en el Ejemplo 2. Como resultado, se observaron cuatro bandas que indicaban actividad de proteasa para el extracto de la *E. coli* que expresa la colagenasa H de fusión (Fig. 7). Por otro lado, para la solución de la colagenasa H de fusión sometida a la cromatografía por afinidad, se observó una banda que indicaba el peso molecular máximo como una banda principal

entre las cuatro bandas mencionadas anteriormente (Fig. 8). Basándose en la comparación y el análisis de estas bandas, se encontró que se degradaba parte o todo el CBD en la colagenasa H de fusión expresada por *E. coli*. Los resultados anteriores mostraron que la colagenasa H de fusión que tenía el CBD se recogió satisfactoriamente de forma selectiva mediante purificación del extracto de la *E. coli* que expresa la colagenasa H de fusión mediante la cromatografía por afinidad y de ese modo se retiró la colagenasa en la que se degrada parte o todo el CBD.

Aplicabilidad Industrial

De acuerdo con la presente invención, se puede producir una colagenasa como una proteína recombinante con pureza elevada y sin incluir un producto degradado causado por una acción de un huésped. El uso de una colagenasa producida con el método de la presente invención permite, por ejemplo, que los islotes pancreáticos se separen de un páncreas sin disminuir la calidad de los islotes pancreáticos, contribuyendo de ese modo en gran medida al trasplante de islotes pancreáticos en pacientes diabéticos.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD. TOHOKU UNIVERSITY

20 <120> Una colagenasa con una etiqueta de afinidad y su método de preparación

<130> M0833

<150> JP 2008-295922

25 <151> 19-11-2008

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.1

30

<210> 1

<211> 1118

<212> PRT

<213> *Clostridium histolyticum*

35

<220>

<221> SEÑAL

<222> (-110)..(-1)

<223>

40

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(1008)

<223>

45

<400> 1

ES 2 531 402 T3

Met Lys Lys Asn Ile Leu Lys Ile Leu Met Asp Ser Tyr Ser Lys
-110 -105 -100

Glu Ser Lys Ile Gln Thr Val Arg Arg Val Thr Ser Val Ser Leu Leu
-95 -90 -85 -80

Ala Val Tyr Leu Thr Met Asn Thr Ser Ser Leu Val Leu Ala Lys Pro
 -75 -70 -65

Ile Glu Asn Thr Asn Asp Thr Ser Ile Lys Asn Val Glu Lys Leu Arg

-60 -55 -50

Asn Ala Pro Asn Glu Glu Asn Ser Lys Lys Val Glu Asp Ser Lys Asn
 -45 -40 -35

Asp Lys Val Glu His Val Lys Asn Ile Glu Glu Ala Lys Val Glu Gln
 -30 -25 -20

Val Ala Pro Glu Val Lys Ser Lys Ser Thr Leu Arg Ser Ala Ser Ile
 -15 -10 -5 -1 1

Ala Asn Thr Asn Ser Glu Lys Tyr Asp Phe Glu Tyr Leu Asn Gly Leu
 5 10 15

Ser Tyr Thr Glu Leu Thr Asn Leu Ile Lys Asn Ile Lys Trp Asn Gln
 20 25 30

Ile Asn Gly Leu Phe Asn Tyr Ser Thr Gly Ser Gln Lys Phe Phe Gly
 35 40 45

Asp Lys Asn Arg Val Gln Ala Ile Ile Asn Ala Leu Gln Glu Ser Gly
 50 55 60 65

Arg Thr Tyr Thr Ala Asn Asp Met Lys Gly Ile Glu Thr Phe Thr Glu
 70 75 80

Val Leu Arg Ala Gly Phe Tyr Leu Gly Tyr Tyr Asn Asp Gly Leu Ser
 85 90 95

Tyr Leu Asn Asp Arg Asn Phe Gln Asp Lys Cys Ile Pro Ala Met Ile
 100 105 110

Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe Lys Leu Gly Thr Ala Val Gln Asp
 115 120 125

Glu Val Ile Thr Ser Leu Gly Lys Leu Ile Gly Asn Ala Ser Ala Asn
 130 135 140 145

Ala Glu Val Val Asn Asn Cys Val Pro Val Leu Lys Gln Phe Arg Glu
 150 155 160

Asn Leu Asn Gln Tyr Ala Pro Asp Tyr Val Lys Gly Thr Ala Val Asn
 165 170 175

Glu Leu Ile Lys Gly Ile Glu Phe Asp Phe Ser Gly Ala Ala Tyr Glu
 180 185 190

Lys Asp Val Lys Thr Met Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Pro Phe Ile
 195 200 205

Asn Glu Leu Lys Ala Leu Gly Leu Tyr Gly Asn Ile Thr Ser Ala Thr
 210 215 220 225

Glu Trp Ala Ser Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Leu Ser Lys Phe Gly Leu
 230 235 240

Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Asp Ile Val Gln Ser Leu Glu Lys Ala Val
 245 250 255

Asp Met Tyr Lys Tyr Gly Lys Ile Ala Phe Val Ala Met Glu Arg Ile
 260 265 270

Thr Trp Asp Tyr Asp Gly Ile Gly Ser Asn Gly Lys Lys Val Asp His
 275 280 285

Asp Lys Phe Leu Asp Asp Ala Glu Lys His Tyr Leu Pro Lys Thr Tyr
 290 295 300 305

Thr Phe Asp Asn Gly Thr Phe Ile Ile Arg Ala Gly Asp Lys Val Ser

310	315	320
Glu Glu Lys Ile Lys Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Arg Glu Val Lys Ser		
325	330	335
Gln Phe His Arg Val Val Gly Asn Asp Lys Ala Leu Glu Val Gly Asn		
340	345	350
Ala Asp Asp Val Leu Thr Met Lys Ile Phe Asn Ser Pro Glu Glu Tyr		
355	360	365
Lys Phe Asn Thr Asn Ile Asn Gly Val Ser Thr Asp Asn Gly Gly Leu		
370	375	380
Tyr Ile Glu Pro Arg Gly Thr Phe Tyr Thr Tyr Glu Arg Thr Pro Gln		
390	395	400
Gln Ser Ile Phe Ser Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr His		
405	410	415
Tyr Leu Gln Ala Arg Tyr Leu Val Asp Gly Leu Trp Gly Gln Gly Pro		
420	425	430
Phe Tyr Glu Lys Asn Arg Leu Thr Trp Phe Asp Glu Gly Thr Ala Glu		
435	440	445
Phe Phe Ala Gly Ser Thr Arg Thr Ser Gly Val Leu Pro Arg Lys Ser		
450	455	460
Ile Leu Gly Tyr Leu Ala Lys Asp Lys Val Asp His Arg Tyr Ser Leu		
470	475	480
Lys Lys Thr Leu Asn Ser Gly Tyr Asp Asp Ser Asp Trp Met Phe Tyr		
485	490	495

Asn Tyr Gly Phe Ala Val Ala His Tyr Leu Tyr Glu Lys Asp Met Pro
 500 505 510

Thr Phe Ile Lys Met Asn Lys Ala Ile Leu Asn Thr Asp Val Lys Ser
 515 520 525

Tyr Asp Glu Ile Ile Lys Lys Leu Ser Asp Asp Ala Asn Lys Asn Thr
 530 535 540 545

Glu Tyr Gln Asn His Ile Gln Glu Leu Ala Asp Lys Tyr Gln Gly Ala
 550 555 560

Gly Ile Pro Leu Val Ser Asp Asp Tyr Leu Lys Asp His Gly Tyr Lys
 565 570 575

Lys Ala Ser Glu Val Tyr Ser Glu Ile Ser Lys Ala Ala Ser Leu Thr
 580 585 590

Asn Thr Ser Val Thr Ala Glu Lys Ser Gln Tyr Phe Asn Thr Phe Thr
 595 600 605

Leu Arg Gly Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Ser Lys Gly Glu Phe Lys Asp
 610 615 620 625

Trp Asp Glu Met Ser Lys Lys Leu Asp Gly Thr Leu Glu Ser Leu Ala
 630 635 640

Lys Asn Ser Trp Ser Gly Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr Asn
 645 650 655

Tyr Arg Val Thr Ser Asp Asn Lys Val Gln Tyr Asp Val Val Phe His
 660 665 670

Gly Val Leu Thr Asp Asn Ala Asp Ile Ser Asn Asn Lys Ala Pro Ile

675 680 685

Ala Lys Val Thr Gly Pro Ser Thr Gly Ala Val Gly Arg Asn Ile Glu
690 695 700 705

Phe Ser Gly Lys Asp Ser Lys Asp Glu Asp Gly Lys Ile Val Ser Tyr
710 715 720

Asp Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ala Thr Ser Arg Gly Lys Asn Ser Val
725 730 735

His Ala Tyr Lys Lys Ala Gly Thr Tyr Asn Val Thr Leu Lys Val Thr
740 745 750

Asp Asp Lys Gly Ala Thr Ala Thr Glu Ser Phe Thr Ile Glu Ile Lys
755 760 765

Asn Glu Asp Thr Thr Thr Pro Ile Thr Lys Glu Met Glu Pro Asn Asp
770 775 780 785

Asp Ile Lys Glu Ala Asn Gly Pro Ile Val Glu Gly Val Thr Val Lys
790 795 800

Gly Asp Leu Asn Gly Ser Asp Asp Ala Asp Thr Phe Tyr Phe Asp Val
805 810 815

Lys Glu Asp Gly Asp Val Thr Ile Glu Leu Pro Tyr Ser Gly Ser Ser
820 825 830

Asn Phe Thr Trp Leu Val Tyr Lys Glu Gly Asp Asp Gln Asn His Ile
835 840 845

Ala Ser Gly Ile Asp Lys Asn Asn Ser Lys Val Gly Thr Phe Lys Ser
850 855 860 865

Thr Lys Gly Arg His Tyr Val Phe Ile Tyr Lys His Asp Ser Ala Ser
 870 875 880

Asn Ile Ser Tyr Ser Leu Asn Ile Lys Gly Leu Gly Asn Glu Lys Leu
 885 890 895

Lys Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Ser Asp Lys Ala Thr Val Ile Pro
 900 905 910

Asn Phe Asn Thr Thr Met Gln Gly Ser Leu Leu Gly Asp Asp Ser Arg
 915 920 925

Asp Tyr Tyr Ser Phe Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu Val Asn Ile Glu
 930 935 940 945

Leu Asp Lys Lys Asp Glu Phe Gly Val Thr Trp Thr Leu His Pro Glu
 950 955 960

Ser Asn Ile Asn Asp Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Val Asp Gly Asn Lys
 965 970 975

Val Ser Asn Lys Val Lys Leu Arg Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Leu Val
 980 985 990

Tyr Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu Leu Arg Val Asn Lys
 995 1000 1005

5 <210> 2
 <211> 1118
 <212> PRT
 <213> *Clostridium histolyticum*

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (-110)..(-1)

15 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(1008)

<400> 2

ES 2 531 402 T3

Met Lys Lys Asn Ile Leu Lys Ile Leu Met Asp Ser Tyr Ser Lys
-110 -105 -100

Glu Ser Lys Ile Gln Thr Val Arg Arg Val Thr Ser Val Ser Leu Leu
-95 -90 -85 -80

Ala Val Tyr Leu Thr Met Asn Thr Ser Ser Leu Val Leu Ala Lys Pro
-75 -70 -65

Ile Glu Asn Thr Asn Asp Thr Ser Ile Lys Asn Val Glu Lys Leu Arg
-60 -55 -50

Asn Ala Pro Asn Glu Glu Asn Ser Lys Lys Val Glu Asp Ser Lys Asn
-45 -40 -35

Asp Lys Val Glu His Val Lys Asn Ile Glu Glu Ala Lys Val Glu Gln
-30 -25 -20

Val Ala Pro Glu Val Lys Ser Lys Ser Thr Leu Arg Ser Ala Ser Ile
-15 -10 -5 -1 1

Ala Asn Thr Asn Ser Glu Lys Tyr Asp Phe Glu Tyr Leu Asn Gly Leu
5 10 15

Ser Tyr Thr Glu Leu Thr Asn Leu Ile Lys Asn Ile Lys Trp Asn Gln
20 25 30

Ile Asn Gly Leu Phe Asn Tyr Ser Thr Gly Ser Gln Lys Phe Phe Gly
35 40 45

Asp Lys Asn Arg Val Gln Ala Ile Ile Asn Ala Leu Gln Glu Ser Gly
 50 55 60 65

Arg Thr Tyr Thr Ala Asn Asp Met Lys Gly Ile Glu Thr Phe Thr Glu
 70 75 80

Val Leu Arg Ala Gly Phe Tyr Leu Gly Tyr Tyr Asn Asp Gly Leu Ser
 85 90 95

Tyr Leu Asn Asp Arg Asn Phe Gln Asp Lys Cys Ile Pro Ala Met Ile
 100 105 110

Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe Lys Leu Gly Thr Ala Val Gln Asp
 115 120 125

Glu Val Ile Thr Ser Leu Gly Lys Leu Ile Gly Asn Ala Ser Ala Asn
 130 135 140 145

Ala Glu Val Val Asn Asn Cys Val Pro Val Leu Lys Gln Phe Arg Glu
 150 155 160

Asn Leu Asn Gln Tyr Ala Pro Asp Tyr Val Lys Gly Thr Ala Val Asn
 165 170 175

Glu Leu Ile Lys Gly Ile Glu Phe Asp Phe Ser Gly Ala Ala Tyr Glu
 180 185 190

Lys Asp Val Lys Thr Met Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Pro Phe Ile
 195 200 205

Asn Glu Leu Lys Ala Leu Gly Leu Tyr Gly Asn Ile Thr Ser Ala Thr
 210 215 220 225

Glu Trp Ala Ser Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Leu Ser Lys Phe Gly Leu
 230 235 240

Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Asp Ile Val Gln Ser Leu Glu Lys Ala Val
 245 250 255

Asp Met Tyr Lys Tyr Gly Lys Ile Ala Phe Val Ala Met Glu Arg Ile
 260 265 270

Thr Trp Asp Tyr Asp Gly Ile Gly Ser Asn Gly Lys Lys Val Asp His
 275 280 285

Asp Lys Phe Leu Asp Asp Ala Glu Lys His Tyr Leu Pro Lys Thr Tyr
 290 295 300 305

Thr Phe Asp Asn Gly Thr Phe Ile Ile Arg Ala Gly Asp Lys Val Ser
 310 315 320

Glu Glu Lys Ile Lys Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Arg Glu Val Lys Ser
 325 330 335

Gln Phe His Arg Val Val Gly Asn Asp Lys Ala Leu Glu Val Gly Asn
 340 345 350

Ala Asp Asp Val Leu Thr Met Lys Ile Phe Asn Ser Pro Glu Glu Tyr
 355 360 365

Lys Phe Asn Thr Asn Ile Asn Gly Val Ser Thr Asp Asn Gly Gly Leu
 370 375 380 385

Tyr Ile Glu Pro Arg Gly Thr Phe Tyr Thr Tyr Glu Arg Thr Pro Gln
 390 395 400

Gln Ser Ile Phe Ser Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr His
 405 410 415

Tyr Leu Gln Ala Arg Tyr Leu Val Asp Gly Leu Trp Gly Gln Gly Pro
 420 425 430

Phe Tyr Glu Lys Asn Arg Leu Thr Trp Phe Asp Glu Gly Thr Ala Glu
 435 440 445

Phe Phe Ala Gly Ser Thr Arg Thr Ser Gly Val Leu Pro Arg Lys Ser
 450 455 460 465

Ile Leu Gly Tyr Leu Ala Lys Asp Lys Val Asp His Arg Tyr Ser Leu
 470 475 480

Lys Lys Thr Leu Asn Ser Gly Tyr Asp Asp Ser Asp Trp Met Phe Tyr
 485 490 495

Asn Tyr Gly Phe Ala Val Ala His Tyr Leu Tyr Glu Lys Asp Met Pro
 500 505 510

Thr Phe Ile Lys Met Asn Lys Ala Ile Leu Asn Thr Asp Val Lys Ser
 515 520 525

Tyr Asp Glu Ile Ile Lys Lys Leu Ser Asp Asp Ala Asn Lys Asn Thr
 530 535 540 545

Glu Tyr Gln Asn His Ile Gln Glu Leu Ala Asp Lys Tyr Gln Gly Ala
 550 555 560

Gly Ile Pro Leu Val Ser Asp Asp Tyr Leu Lys Asp His Gly Tyr Lys
 565 570 575

Lys Ala Ser Glu Val Tyr Ser Glu Ile Ser Lys Ala Ala Ser Leu Thr
 580 585 590

Asn Thr Ser Val Thr Ala Glu Lys Ser Gln Tyr Phe Asn Thr Phe Thr
 595 600 605

Leu Arg Gly Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Ser Lys Gly Glu Phe Lys Asp
 610 615 620 625

Trp Asp Glu Met Ser Lys Lys Leu Asp Gly Thr Leu Glu Ser Leu Ala
 630 635 640

Lys Asn Ser Trp Ser Gly Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr Asn
 645 650 655

Tyr Arg Val Thr Ser Asp Asn Lys Val Gln Tyr Asp Val Val Phe His
 660 665 670

Gly Val Leu Thr Asp Asn Ala Asp Ile Ser Asn Asn Lys Ala Pro Ile
 675 680 685

Ala Lys Val Thr Gly Pro Ser Thr Gly Ala Val Gly Arg Asn Ile Glu
 690 695 700 705

Phe Ser Gly Lys Asp Ser Lys Asp Glu Asp Gly Lys Ile Val Ser Tyr
 710 715 720

Asp Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ala Thr Ser Arg Gly Lys Asn Ser Val
 725 730 735

His Ala Tyr Lys Lys Ala Gly Thr Tyr Asn Val Thr Leu Lys Val Thr
 740 745 750

Asp Asp Lys Gly Ala Thr Ala Thr Glu Ser Phe Thr Ile Glu Ile Lys
 755 760 765

Asn Glu Asp Thr Thr Thr Pro Ile Thr Lys Glu Met Glu Pro Asn Asp
 770 775 780 785

Asp Ile Lys Glu Ala Asn Gly Pro Ile Val Glu Gly Val Thr Val Lys
790 795 800

Gly Asp Leu Asn Gly Ser Asp Asp Ala Asp Thr Phe Tyr Phe Asp Val
805 810 815

Lys Glu Asp Gly Asp Val Thr Ile Glu Leu Pro Tyr Ser Gly Ser Ser
820 825 830

Asn Phe Thr Trp Leu Val Tyr Lys Glu Gly Asp Asp Gln Asn His Ile
835 840 845

Ala Ser Gly Ile Asp Lys Asn Asn Ser Lys Val Gly Thr Phe Lys Ser
850 855 860 865

Thr Lys Gly Arg His Tyr Val Phe Ile Tyr Lys His Asp Ser Ala Ser
870 875 880

Asn Ile Ser Tyr Ser Leu Asn Ile Lys Gly Leu Gly Asn Glu Lys Leu
885 890 895

Lys Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Ser Asp Lys Ala Thr Val Ile Pro
900 905 910

Asn Phe Asn Thr Thr Met Gln Gly Ser Leu Leu Gly Asp Asp Ser Arg
915 920 925

Asp Tyr Tyr Ser Phe Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu Val Asn Ile Glu
930 935 940 945

Leu Asp Lys Lys Asp Glu Phe Gly Val Thr Trp Thr Leu His Pro Glu
950 955 960

Ser Asn Ile Asn Asp Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Val Asp Gly Asn Lys
965 970 975

Val Ser Asn Lys Val Lys Leu Arg Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Leu Val
980 985 990

Tyr Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu Leu Arg Val Ser Arg
995 1000 1005

5 <210> 3
<211> 1131
<212> PRT
<213> *Clostridium histolyticum*

10 <220>
<221> SEÑAL
<222> (-110)..(-1)

15 <220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(1021)
<223>

<400> 3

Met Lys Lys Asn Ile Leu Lys Ile Leu Met Asp Ser Tyr Ser Lys
-110 -105 -100

Glu Ser Lys Ile Gln Thr Val Arg Arg Val Thr Ser Val Ser Leu Leu
-95 -90 -85 -80

Ala Val Tyr Leu Thr Met Asn Thr Ser Ser Leu Val Leu Ala Lys Pro
-75 -70 -65

Ile Glu Asn Thr Asn Asp Thr Ser Ile Lys Asn Val Glu Lys Leu Arg
-60 -55 -50

Asn Ala Pro Asn Glu Glu Asn Ser Lys Lys Val Glu Asp Ser Lys Asn
-45 -40 -35

Asp Lys Val Glu His Val Lys Asn Ile Glu Glu Ala Lys Val Glu Gln
 -30 -25 -20

Val Ala Pro Glu Val Lys Ser Lys Ser Thr Leu Arg Ser Ala Ser Ile
 -15 -10 -5 -1 1

Ala Asn Thr Asn Ser Glu Lys Tyr Asp Phe Glu Tyr Leu Asn Gly Leu
 5 10 15

Ser Tyr Thr Glu Leu Thr Asn Leu Ile Lys Asn Ile Lys Trp Asn Gln
 20 25 30

Ile Asn Gly Leu Phe Asn Tyr Ser Thr Gly Ser Gln Lys Phe Phe Gly
 35 40 45

Asp Lys Asn Arg Val Gln Ala Ile Ile Asn Ala Leu Gln Glu Ser Gly
 50 55 60 65

Arg Thr Tyr Thr Ala Asn Asp Met Lys Gly Ile Glu Thr Phe Thr Glu
 70 75 80

Val Leu Arg Ala Gly Phe Tyr Leu Gly Tyr Tyr Asn Asp Gly Leu Ser
 85 90 95

Tyr Leu Asn Asp Arg Asn Phe Gln Asp Lys Cys Ile Pro Ala Met Ile
 100 105 110

Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe Lys Leu Gly Thr Ala Val Gln Asp
 115 120 125

Glu Val Ile Thr Ser Leu Gly Lys Leu Ile Gly Asn Ala Ser Ala Asn
 130 135 140 145

Ala Glu Val Val Asn Asn Cys Val Pro Val Leu Lys Gln Phe Arg Glu
 150 155 160

Asn Leu Asn Gln Tyr Ala Pro Asp Tyr Val Lys Gly Thr Ala Val Asn
165 170 175

Glu Leu Ile Lys Gly Ile Glu Phe Asp Phe Ser Gly Ala Ala Tyr Glu
180 185 190

Lys Asp Val Lys Thr Met Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Pro Phe Ile
195 200 205

Asn Glu Leu Lys Ala Leu Gly Leu Tyr Gly Asn Ile Thr Ser Ala Thr
210 215 220 225

Glu Trp Ala Ser Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Leu Ser Lys Phe Gly Leu
230 235 240

Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Asp Ile Val Gln Ser Leu Glu Lys Ala Val
245 250 255

Asp Met Tyr Lys Tyr Gly Lys Ile Ala Phe Val Ala Met Glu Arg Ile
260 265 270

Thr Trp Asp Tyr Asp Gly Ile Gly Ser Asn Gly Lys Lys Val Asp His
275 280 285

Asp Lys Phe Leu Asp Asp Ala Glu Lys His Tyr Leu Pro Lys Thr Tyr
290 295 300 305

Thr Phe Asp Asn Gly Thr Phe Ile Ile Arg Ala Gly Asp Lys Val Ser
310 315 320

Glu Glu Lys Ile Lys Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Arg Glu Val Lys Ser
325 330 335

Gln Phe His Arg Val Val Gly Asn Asp Lys Ala Leu Glu Val Gly Asn
 340 345 350

Ala Asp Asp Val Leu Thr Met Lys Ile Phe Asn Ser Pro Glu Glu Tyr
 355 360 365

Lys Phe Asn Thr Asn Ile Asn Gly Val Ser Thr Asp Asn Gly Gly Leu
 370 375 380 385

Tyr Ile Glu Pro Arg Gly Thr Phe Tyr Thr Tyr Glu Arg Thr Pro Gln
 390 395 400

Gln Ser Ile Phe Ser Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr His
 405 410 415

Tyr Leu Gln Ala Arg Tyr Leu Val Asp Gly Leu Trp Gly Gln Gly Pro
 420 425 430

Phe Tyr Glu Lys Asn Arg Leu Thr Trp Phe Asp Glu Gly Thr Ala Glu
 435 440 445

Phe Phe Ala Gly Ser Thr Arg Thr Ser Gly Val Leu Pro Arg Lys Ser
 450 455 460 465

Ile Leu Gly Tyr Leu Ala Lys Asp Lys Val Asp His Arg Tyr Ser Leu
 470 475 480

Lys Lys Thr Leu Asn Ser Gly Tyr Asp Asp Ser Asp Trp Met Phe Tyr
 485 490 495

Asn Tyr Gly Phe Ala Val Ala His Tyr Leu Tyr Glu Lys Asp Met Pro
 500 505 510

Thr Phe Ile Lys Met Asn Lys Ala Ile Leu Asn Thr Asp Val Lys Ser
 515 520 525

Tyr Asp Glu Ile Ile Lys Lys Leu Ser Asp Asp Ala Asn Lys Asn Thr
 530 535 540 545

Glu Tyr Gln Asn His Ile Gln Glu Leu Ala Asp Lys Tyr Gln Gly Ala
 550 555 560

Gly Ile Pro Leu Val Ser Asp Asp Tyr Leu Lys Asp His Gly Tyr Lys
 565 570 575

Lys Ala Ser Glu Val Tyr Ser Glu Ile Ser Lys Ala Ala Ser Leu Thr
 580 585 590

Asn Thr Ser Val Thr Ala Glu Lys Ser Gln Tyr Phe Asn Thr Phe Thr
 595 600 605

Leu Arg Gly Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Ser Lys Gly Glu Phe Lys Asp
 610 615 620 625

Trp Asp Glu Met Ser Lys Lys Leu Asp Gly Thr Leu Glu Ser Leu Ala
 630 635 640

Lys Asn Ser Trp Ser Gly Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr Asn
 645 650 655

Tyr Arg Val Thr Ser Asp Asn Lys Val Gln Tyr Asp Val Val Phe His
 660 665 670

Gly Val Leu Thr Asp Asn Ala Asp Ile Ser Asn Asn Lys Ala Pro Ile
 675 680 685

Ala Lys Val Thr Gly Pro Ser Thr Gly Ala Val Gly Arg Asn Ile Glu
 690 695 700 705

Phe Ser Gly Lys Asp Ser Lys Asp Glu Asp Gly Lys Ile Val Ser Tyr
710 715 720

Asp Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ala Thr Ser Arg Gly Lys Asn Ser Val
725 730 735

His Ala Tyr Lys Lys Ala Gly Thr Tyr Asn Val Thr Leu Lys Val Thr
740 745 750

Asp Asp Lys Gly Ala Thr Ala Thr Glu Ser Phe Thr Ile Glu Ile Lys
755 760 765

Asn Glu Asp Thr Thr Thr Pro Ile Thr Lys Glu Met Glu Pro Asn Asp
770 775 780 785

Asp Ile Lys Glu Ala Asn Gly Pro Ile Val Glu Gly Val Thr Val Lys
790 795 800

Gly Asp Leu Asn Gly Ser Asp Asp Ala Asp Thr Phe Tyr Phe Asp Val
805 810 815

Lys Glu Asp Gly Asp Val Thr Ile Glu Leu Pro Tyr Ser Gly Ser Ser
820 825 830

Asn Phe Thr Trp Leu Val Tyr Lys Glu Gly Asp Asp Gln Asn His Ile
835 840 845

Ala Ser Gly Ile Asp Lys Asn Asn Ser Lys Val Gly Thr Phe Lys Ser
850 855 860 865

Thr Lys Gly Arg His Tyr Val Phe Ile Tyr Lys His Asp Ser Ala Ser
870 875 880

Asn Ile Ser Tyr Ser Leu Asn Ile Lys Gly Leu Gly Asn Glu Lys Leu
885 890 895

Lys Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Ser Asp Lys Ala Thr Val Ile Pro
 900 905 910

Asn Phe Asn Thr Thr Met Gln Gly Ser Leu Leu Gly Asp Asp Ser Arg
 915 920 925

Asp Tyr Tyr Ser Phe Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu Val Asn Ile Glu
 930 935 940 945

Leu Asp Lys Lys Asp Glu Phe Gly Val Thr Trp Thr Leu His Pro Glu
 950 955 960

Ser Asn Ile Asn Asp Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Val Asp Gly Asn Lys
 965 970 975

Val Ser Asn Lys Val Lys Leu Arg Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Leu Val
 980 985 990

Tyr Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu Leu Arg Val Ser Arg Lys
 995 1000 1005

Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 1010 1015 1020

5 <210> 4
 <211> 3396
 <212> ADN
 <213> *Clostridium histolyticum*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(3396)

<400> 4

atg aaa aaa aat att tta aag att ctt atg gat agt tat tct aaa gaa 48
 Met Lys Lys Asn Ile Leu Lys Ile Leu Met Asp Ser Tyr Ser Lys Glu

1 5 10 15
 tct aaa att caa act gta cgt agg gtt acg agt gta tca ctt tta gcg 96
 Ser Lys Ile Gln Thr Val Arg Arg Val Thr Ser Val Ser Leu Leu Ala
 20 25 30
 gta tat ctt act atg aat act tca agt tta gtt tta gca aaa cca ata 144
 Val Tyr Leu Thr Met Asn Thr Ser Ser Leu Val Leu Ala Lys Pro Ile
 35 40 45
 gaa aat act aat gat act agt ata aaa aat gtg gag aaa tta aga aat 192
 Glu Asn Thr Asn Asp Thr Ser Ile Lys Asn Val Glu Lys Leu Arg Asn
 50 55 60
 gct cca aat gaa gag aat agt aaa aag gta gaa gat agt aaa aat gat 240
 Ala Pro Asn Glu Glu Asn Ser Lys Ser Lys Val Glu Asp Ser Lys Asn Asp
 65 70 75 80
 aag gta gaa cat gtg aaa aat ata gaa gag gca aag gtt gag caa gtt 288
 Lys Val Glu His Val Lys Asn Ile Glu Glu Ala Lys Val Glu Gln Val
 85 90 95
 gca ccc gaa gta aaa tct aaa tca act tta aga agt gct tct ata gcg 336
 Ala Pro Glu Val Lys Ser Lys Ser Thr Leu Arg Ser Ala Ser Ile Ala
 100 105 110
 aat act aat tct gag aaa tat gat ttt gag tat tta aat ggt ttg agc 384
 Asn Thr Asn Ser Glu Lys Tyr Asp Phe Glu Tyr Leu Asn Gly Leu Ser
 115 120 125
 tat act gaa ctt aca aat tta att aaa aat ata aag tgg aat caa att 432
 Tyr Thr Glu Leu Thr Asn Leu Ile Lys Asn Ile Lys Trp Asn Gln Ile
 130 135 140
 aat ggt tta ttt aat tat agt aca ggt tct caa aag ttc ttt gga gat 480
 Asn Gly Leu Phe Asn Tyr Ser Thr Gly Ser Gln Lys Phe Phe Gly Asp
 145 150 155 160
 aaa aat cgt gta caa gct ata att aat gct tta caa gaa agt gga aga 528
 Lys Asn Arg Val Gln Ala Ile Ile Asn Ala Leu Gln Glu Ser Gly Arg
 165 170 175
 act tac act gca aat gat atg aag ggt ata gaa act ttc act gag gtt 576
 Thr Tyr Thr Ala Asn Asp Met Lys Gly Ile Glu Thr Phe Thr Glu Val
 180 185 190

tta aga gct ggt ttt tat tta ggg tac tat aat gat ggt tta tct tat 624
 Leu Arg Ala Gly Phe Tyr Leu Gly Tyr Tyr Asn Asp Gly Leu Ser Tyr
 195 200 205

tta aat gat aga aac ttc caa gat aaa tgt ata cct gca atg att gca 672
 Leu Asn Asp Arg Asn Phe Gln Asp Lys Cys Ile Pro Ala Met Ile Ala
 210 215 220

att caa aaa aat cct aac ttt aag cta gga act gca gtt caa gat gaa 720
 Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe Lys Leu Gly Thr Ala Val Gln Asp Glu
 225 230 235 240

gtt ata act tct tta gga aaa cta ata gga aat gct tct gct aat gct 768
 Val Ile Thr Ser Leu Gly Lys Leu Ile Gly Asn Ala Ser Ala Asn Ala
 245 250 255

gaa gta gtt aat aat tgt gta cca gtt cta aaa caa ttt aga gaa aac 816
 Glu Val Val Asn Asn Cys Val Pro Val Leu Lys Gln Phe Arg Glu Asn
 260 265 270

tta aat caa tat gct cct gat tac gtt aaa gga aca gct gta aat gaa 864
 Leu Asn Gln Tyr Ala Pro Asp Tyr Val Lys Gly Thr Ala Val Asn Glu
 275 280 285

tta att aaa ggt att gaa ttc gat ttt tct ggt gct gca tat gaa aaa 912
 Leu Ile Lys Gly Ile Glu Phe Asp Phe Ser Gly Ala Ala Tyr Glu Lys
 290 295 300

gat gtt aag aca atg cct tgg tat gga aaa att gat cca ttt ata aat 960
 Asp Val Lys Thr Met Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Pro Phe Ile Asn
 305 310 315 320

gaa ctt aag gcc tta ggt cta tat gga aat ata aca agt gca act gag 1008
 Glu Leu Lys Ala Leu Gly Leu Tyr Gly Asn Ile Thr Ser Ala Thr Glu
 325 330 335

tgg gca tct gat gtt gga ata tac tat tta agt aaa ttc ggt ctt tac 1056
 Trp Ala Ser Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Leu Ser Lys Phe Gly Leu Tyr
 340 345 350

tca act aac cga aat gac ata gta cag tca ctt gaa aag gct gta gat 1104
 Ser Thr Asn Arg Asn Asp Ile Val Gln Ser Leu Glu Lys Ala Val Asp
 355 360 365

atg tat aag tat ggt aaa ata gcc ttt gta gca atg gag aga ata act 1152
 Met Tyr Lys Tyr Gly Lys Ile Ala Phe Val Ala Met Glu Arg Ile Thr

370	375	380	
tgg gat tat gat ggg att ggt tct aat ggt aaa aag gtg gat cac gat	1200		
Trp Asp Tyr Asp Gly Ile Gly Ser Asn Gly Lys Lys Val Asp His Asp			
385	390	395	400
aag ttc tta gat gat gct gaa aaa cat tat ctg cca aag aca tat act	1248		
Lys Phe Leu Asp Asp Ala Glu Lys His Tyr Leu Pro Lys Thr Tyr Thr			
405	410	415	
ttt gat aat gga acc ttt att ata aga gca ggg gat aag gta tcc gaa	1296		
Phe Asp Asn Gly Thr Phe Ile Ile Arg Ala Gly Asp Lys Val Ser Glu			
420	425	430	
gaa aaa ata aaa agg cta tat tgg gca tca aga gaa gtg aag tct caa	1344		
Glu Lys Ile Lys Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Arg Glu Val Lys Ser Gln			
435	440	445	
ttc cat aga gta gtt ggc aat gat aaa gct tta gag gtg gga aat gcc	1392		
Phe His Arg Val Val Gly Asn Asp Lys Ala Leu Glu Val Gly Asn Ala			
450	455	460	
gat gat gtt tta act atg aaa ata ttt aat agc cca gaa gaa tat aaa	1440		
Asp Asp Val Leu Thr Met Lys Ile Phe Asn Ser Pro Glu Glu Tyr Lys			
465	470	475	480
ttt aat acc aat ata aat ggt gta agc act gat aat ggt ggt cta tat	1488		
Phe Asn Thr Asn Ile Asn Gly Val Ser Thr Asp Asn Gly Gly Leu Tyr			
485	490	495	
ata gaa cca aga ggg act ttc tac act tat gag aga aca cct caa caa	1536		
Ile Glu Pro Arg Gly Thr Phe Tyr Thr Tyr Glu Arg Thr Pro Gln Gln			
500	505	510	
agt ata ttt agt ctt gaa gaa ttg ttt aga cat gaa tat act cac tat	1584		
Ser Ile Phe Ser Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr His Tyr			
515	520	525	
tta caa gcg aga tat ctt gta gat ggt tta tgg ggg caa ggt cca ttt	1632		
Leu Gln Ala Arg Tyr Leu Val Asp Gly Leu Trp Gly Gln Gly Pro Phe			
530	535	540	
tat gaa aaa aat aga tta act tgg ttt gat gaa ggt aca gct gaa ttc	1680		
Tyr Glu Lys Asn Arg Leu Thr Trp Phe Asp Glu Gly Thr Ala Glu Phe			
545	550	555	560

ttt gca gga tct acc cgt aca tct ggt gtt tta cca aga aaa tca ata 1728
 Phe Ala Gly Ser Thr Arg Thr Ser Gly Val Leu Pro Arg Lys Ser Ile
 565 570 575

tta gga tat ttg gct aag gat aaa gta gat cat aga tac tca tta aag 1776
 Leu Gly Tyr Leu Ala Lys Asp Lys Val Asp His Arg Tyr Ser Leu Lys
 580 585 590

aag act ctt aat tca ggg tat gat gac agt gat tgg atg ttc tat aat 1824
 Lys Thr Leu Asn Ser Gly Tyr Asp Asp Ser Asp Trp Met Phe Tyr Asn
 595 600 605

tat gga ttt gca gtt gca cat tac cta tat gaa aaa gat atg cct aca 1872
 Tyr Gly Phe Ala Val Ala His Tyr Leu Tyr Glu Lys Asp Met Pro Thr
 610 615 620

ttt att aag atg aat aaa gct ata ttg aat aca gat gtg aaa tct tat 1920
 Phe Ile Lys Met Asn Lys Ala Ile Leu Asn Thr Asp Val Lys Ser Tyr
 625 630 635 640

gat gaa ata ata aaa aaa tta agt gat gat gca aat aaa aat aca gaa 1968
 Asp Glu Ile Ile Lys Lys Leu Ser Asp Asp Ala Asn Lys Asn Thr Glu
 645 650 655

tat caa aac cat att caa gag tta gca gat aaa tat caa gga gca ggc 2016
 Tyr Gln Asn His Ile Gln Glu Leu Ala Asp Lys Tyr Gln Gly Ala Gly
 660 665 670

ata cct cta gta tca gat gat tac tta aaa gat cat gga tat aag aaa 2064
 Ile Pro Leu Val Ser Asp Asp Tyr Leu Lys Asp His Gly Tyr Lys Lys
 675 680 685

gca tct gaa gta tat tct gaa att tca aaa gct gct tct ctt aca aac 2112
 Ala Ser Glu Val Tyr Ser Glu Ile Ser Lys Ala Ala Ser Leu Thr Asn
 690 695 700

act agt gta aca gca gaa aaa tct caa tat ttt aac aca ttc act tta 2160
 Thr Ser Val Thr Ala Glu Lys Ser Gln Tyr Phe Asn Thr Phe Thr Leu
 705 710 715 720

aga gga act tat aca ggt gaa act tct aaa ggt gaa ttt aaa gat tgg 2208
 Arg Gly Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Ser Lys Gly Glu Phe Lys Asp Trp
 725 730 735

gat gaa atg agt aaa aaa tta gat gga act ttg gag tcc ctt gct aaa 2256
 Asp Glu Met Ser Lys Lys Leu Asp Gly Thr Leu Glu Ser Leu Ala Lys

740	745	750	
aat tct tgg agt gga tac aaa act tta aca gca tac ttt acg aat tat 2304			
Asn Ser Trp Ser Gly Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr Asn Tyr			
755	760	765	
aga gtt aca agc gat aat aaa gtt caa tat gat gta gtt ttc cat ggg 2352			
Arg Val Thr Ser Asp Asn Lys Val Gln Tyr Asp Val Val Phe His Gly			
770	775	780	
gtt tta aca gat aat gcg gat att agt aac aat aag gct cca ata gca 2400			
Val Leu Thr Asp Asn Ala Asp Ile Ser Asn Asn Lys Ala Pro Ile Ala			
785	790	795	800
aag gta act gga cca agc act ggt gct gta gga aga aat att gaa ttt 2448			
Lys Val Thr Gly Pro Ser Thr Gly Ala Val Gly Arg Asn Ile Glu Phe			
805	810	815	
agt gga aaa gat agt aaa gat gaa gat ggt aaa ata gta tca tat gat 2496			
Ser Gly Lys Asp Ser Lys Asp Glu Asp Gly Lys Ile Val Ser Tyr Asp			
820	825	830	
tgg gat ttt ggc gat ggt gca act agt aga ggc aaa aat tca gta cat 2544			
Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ala Thr Ser Arg Gly Lys Asn Ser Val His			
835	840	845	
gct tac aaa aaa gca gga aca tat aat gtt aca tta aaa gta act gac 2592			
Ala Tyr Lys Lys Ala Gly Thr Tyr Asn Val Thr Leu Lys Val Thr Asp			
850	855	860	
gat aag ggt gca aca gct aca gaa agc ttt act ata gaa ata aag aac 2640			
Asp Lys Gly Ala Thr Ala Thr Glu Ser Phe Thr Ile Glu Ile Lys Asn			
865	870	875	880
gaa gat aca aca aca cct ata act aaa gaa atg gaa cct aat gat gat 2688			
Glu Asp Thr Thr Thr Pro Ile Thr Lys Glu Met Glu Pro Asn Asp Asp			
885	890	895	
ata aaa gag gct aat ggt cca ata gtt gaa ggt gtt act gta aaa ggt 2736			
Ile Lys Glu Ala Asn Gly Pro Ile Val Glu Gly Val Thr Val Lys Gly			
900	905	910	
gat tta aat ggt tct gat gat gct gat acc ttc tat ttt gat gta aaa 2784			
Asp Leu Asn Gly Ser Asp Asp Ala Asp Thr Phe Tyr Phe Asp Val Lys			
915	920	925	

gaa gat ggt gat gtt aca att gaa ctt cct tat tca ggg tca tct aat 2832
 Glu Asp Gly Asp Val Thr Ile Glu Leu Pro Tyr Ser Gly Ser Ser Asn
 930 935 940

ttc aca tgg tta gtt tat aaa gag gga gac gat caa aac cat att gca 2880
 Phe Thr Trp Leu Val Tyr Lys Glu Gly Asp Asp Gln Asn His Ile Ala
 945 950 955 960

agt ggt ata gat aag aat aac tca aaa gtt gga aca ttt aaa tct aca 2928
 Ser Gly Ile Asp Lys Asn Asn Ser Lys Val Gly Thr Phe Lys Ser Thr
 965 970 975

aaa gga aga cat tat gtg ttt ata tat aaa cac gat tct gct tca aat 2976
 Lys Gly Arg His Tyr Val Phe Ile Tyr Lys His Asp Ser Ala Ser Asn
 980 985 990

ata tcc tat tct tta aac ata aaa gga tta ggt aac gag aaa ttg aag 3024
 Ile Ser Tyr Ser Leu Asn Ile Lys Gly Leu Gly Asn Glu Lys Leu Lys
 995 1000 1005

gaa aaa gaa aat aat gat tct tct gat aaa gct aca gtt ata cca 3069
 Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Ser Asp Lys Ala Thr Val Ile Pro
 1010 1015 1020

aat ttc aat acc act atg caa ggt tca ctt tta ggt gat gat tca 3114
 Asn Phe Asn Thr Thr Met Gln Gly Ser Leu Leu Gly Asp Asp Ser
 1025 1030 1035

aga gat tat tat tct ttt gag gtt aag gaa gaa ggc gaa gtt aat 3159
 Arg Asp Tyr Tyr Ser Phe Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu Val Asn
 1040 1045 1050

ata gaa cta gat aaa aag gat gaa ttt ggt gta aca tgg aca cta 3204
 Ile Glu Leu Asp Lys Lys Asp Glu Phe Gly Val Thr Trp Thr Leu
 1055 1060 1065

cat cca gag tca aat att aat gac aga ata act tac gga caa gtt 3249
 His Pro Glu Ser Asn Ile Asn Asp Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Val
 1070 1075 1080

gat ggt aat aag gta tct aat aaa gtt aaa tta aga cca gga aaa 3294
 Asp Gly Asn Lys Val Ser Asn Lys Val Lys Leu Arg Pro Gly Lys
 1085 1090 1095

tat tat cta ctt gtt tat aaa tac tca gga tca gga aac tat gag 3339
 Tyr Tyr Leu Leu Val Tyr Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu

1100 1105 1110
 tta agg gta tct aga aag ctt gcg gcc gca ctc gag cac cac cac 3384
 Leu Arg Val Ser Arg Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His
 1115 1120 1125

 cac cac cac tga 3396
 His His His
 1130

5 <210> 5
 <211> 1021
 <212> PRT
 <213> *Clostridium histolyticum*

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (-40)..(-1)

15 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(981)
 <400> 5

Met Lys Arg Lys Cys Leu Ser Lys Arg Leu Met Leu Ala Ile Thr Met
 -40 -35 -30 -25

Ala Thr Ile Phe Thr Val Asn Ser Thr Leu Pro Ile Tyr Ala Ala Val
 -20 -15 -10

Asp Lys Asn Asn Ala Thr Ala Ala Val Gln Asn Glu Ser Lys Arg Tyr
 -5 -1 1 5

Thr Val Ser Tyr Leu Lys Thr Leu Asn Tyr Tyr Asp Leu Val Asp Leu
 10 15 20

Leu Val Lys Thr Glu Ile Glu Asn Leu Pro Asp Leu Phe Gln Tyr Ser
 25 30 35 40

Ser Asp Ala Lys Glu Phe Tyr Gly Asn Lys Thr Arg Met Ser Phe Ile
 45 50 55

Met Asp Glu Ile Gly Arg Arg Ala Pro Gln Tyr Thr Glu Ile Asp His
 60 65 70

Lys Gly Ile Pro Thr Leu Val Glu Val Val Arg Ala Gly Phe Tyr Leu
 75 80 85

Gly Phe His Asn Lys Glu Leu Asn Glu Ile Asn Lys Arg Ser Phe Lys
 90 95 100

Glu Arg Val Ile Pro Ser Ile Leu Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe
 105 110 115 120

Lys Leu Gly Thr Glu Val Gln Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Gly Leu
 125 130 135

Leu Ala Gly Asn Glu Thr Ala Pro Pro Glu Val Val Asn Asn Phe Thr
 140 145 150

Pro Ile Leu Gln Asp Cys Ile Lys Asn Ile Asp Arg Tyr Ala Leu Asp
 155 160 165

Asp Leu Lys Ser Lys Ala Leu Phe Asn Val Leu Ala Ala Pro Thr Tyr
 170 175 180

Asp Ile Thr Glu Tyr Leu Arg Ala Thr Lys Glu Lys Pro Glu Asn Thr
 185 190 195 200

Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Gly Phe Ile Asn Glu Leu Lys Lys Leu
 205 210 215

Ala Leu Tyr Gly Lys Ile Asn Asp Asn Asn Ser Trp Ile Ile Asp Asn
 220 225 230

Gly Ile Tyr His Ile Ala Pro Leu Gly Lys Leu His Ser Asn Asn Lys
235 240 245

Ile Gly Ile Glu Thr Leu Thr Glu Val Met Lys Val Tyr Pro Tyr Leu
250 255 260

Ser Met Gln His Leu Gln Ser Ala Asp Gln Ile Lys Arg His Tyr Asp
265 270 275 280

Ser Lys Asp Ala Glu Gly Asn Lys Ile Pro Leu Asp Lys Phe Lys Lys
285 290 295

Glu Gly Lys Glu Lys Tyr Cys Pro Lys Thr Tyr Thr Phe Asp Asp Gly
300 305 310

Lys Val Ile Ile Lys Ala Gly Ala Arg Val Glu Glu Glu Lys Val Lys
315 320 325

Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Lys Glu Val Asn Ser Gln Phe Phe Arg Val
330 335 340

Tyr Gly Ile Asp Lys Pro Leu Glu Glu Gly Asn Pro Asp Asp Ile Leu
345 350 355 360

Thr Met Val Ile Tyr Asn Ser Pro Glu Glu Tyr Lys Leu Asn Ser Val
365 370 375

Leu Tyr Gly Tyr Asp Thr Asn Asn Gly Gly Met Tyr Ile Glu Pro Glu
380 385 390

Gly Thr Phe Phe Thr Tyr Glu Arg Glu Ala Gln Glu Ser Thr Tyr Thr
395 400 405

Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr His Tyr Leu Gln Gly Arg
 410 415 420

Tyr Ala Val Pro Gly Gln Trp Gly Arg Thr Lys Leu Tyr Asp Asn Asp
 425 430 435 440

Arg Leu Thr Trp Tyr Glu Glu Gly Gly Ala Glu Leu Phe Ala Gly Ser
 445 450 455

Thr Arg Thr Ser Gly Ile Leu Pro Arg Lys Ser Ile Val Ser Asn Ile
 460 465 470

His Asn Thr Thr Arg Asn Asn Arg Tyr Lys Leu Ser Asp Thr Val His
 475 480 485

Ser Lys Tyr Gly Ala Ser Phe Glu Phe Tyr Asn Tyr Ala Cys Met Phe
 490 495 500

Met Asp Tyr Met Tyr Asn Lys Asp Met Gly Ile Leu Asn Lys Leu Asn
 505 510 515 520

Asp Leu Ala Lys Asn Asn Asp Val Asp Gly Tyr Asp Asn Tyr Ile Arg
 525 530 535

Asp Leu Ser Ser Asn Tyr Ala Leu Asn Asp Lys Tyr Gln Asp His Met
 540 545 550

Gln Glu Arg Ile Asp Asn Tyr Glu Asn Leu Thr Val Pro Phe Val Ala
 555 560 565

Asp Asp Tyr Leu Val Arg His Ala Tyr Lys Asn Pro Asn Glu Ile Tyr
 570 575 580

Ser Glu Ile Ser Glu Val Ala Lys Leu Lys Asp Ala Lys Ser Glu Val
 585 590 595 600

Lys Lys Ser Gln Tyr Phe Ser Thr Phe Thr Leu Arg Gly Ser Tyr Thr
605 610 615

Gly Gly Ala Ser Lys Gly Lys Leu Glu Asp Gln Lys Ala Met Asn Lys
620 625 630

Phe Ile Asp Asp Ser Leu Lys Lys Leu Asp Thr Tyr Ser Trp Ser Gly
635 640 645

Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr Asn Tyr Lys Val Asp Ser Ser
650 655 660

Asn Arg Val Thr Tyr Asp Val Val Phe His Gly Tyr Leu Pro Asn Glu
665 670 675 680

Gly Asp Ser Lys Asn Ser Leu Pro Tyr Gly Lys Ile Asn Gly Thr Tyr
685 690 695

Lys Gly Thr Glu Lys Glu Lys Ile Lys Phe Ser Ser Glu Gly Ser Phe
700 705 710

Asp Pro Asp Gly Lys Ile Val Ser Tyr Glu Trp Asp Phe Gly Asp Gly
715 720 725

Asn Lys Ser Asn Glu Glu Asn Pro Glu His Ser Tyr Asp Lys Val Gly
730 735 740

Thr Tyr Thr Val Lys Leu Lys Val Thr Asp Asp Lys Gly Glu Ser Ser
745 750 755 760

Val Ser Thr Thr Thr Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ser Glu Asn Lys Leu
765 770 775

Pro Val Ile Tyr Met His Val Pro Lys Ser Gly Ala Leu Asn Gln Lys
 780 785 790

Val Val Phe Tyr Gly Lys Gly Thr Tyr Asp Pro Asp Gly Ser Ile Ala
 795 800 805

Gly Tyr Gln Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Asp Phe Ser Ser Glu Gln
 810 815 820

Asn Pro Ser His Val Tyr Thr Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Val Thr Leu
 825 830 835 840

Arg Val Met Asp Ser Ser Gly Gln Met Ser Glu Lys Thr Met Lys Ile
 845 850 855

Lys Ile Thr Asp Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro Asn
 860 865 870

Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro Val
 875 880 885

Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp
 890 895 900

Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr
 905 910 915 920

Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val Ser
 925 930 935

Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp
 940 945 950

Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr
 955 960 965

Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Gly Arg
 970 975 980

5 <210> 6
 <211> 1021
 <212> PRT
 <213> *Clostridium histolyticum*

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (-40)..(-1)

15 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(981)

<400> 6

Met Lys Arg Lys Cys Leu Ser Lys Arg Leu Met Leu Ala Ile Thr Met
 -40 -35 -30 -25

Ala Thr Ile Phe Thr Val Asn Ser Thr Leu Pro Ile Tyr Ala Ala Val
 -20 -15 -10

Asp Lys Asn Asn Ala Thr Ala Ala Val Gln Asn Glu Ser Lys Arg Tyr
 -5 -1 1 5

Thr Val Ser Tyr Leu Lys Thr Leu Asn Tyr Tyr Asp Leu Val Asp Leu
 10 15 20

Leu Val Lys Thr Glu Ile Glu Asn Leu Pro Asp Leu Phe Gln Tyr Ser
 25 30 35 40

Ser Asp Ala Lys Glu Phe Tyr Gly Asn Lys Thr Arg Met Ser Phe Ile
 45 50 55

Met Asp Glu Ile Gly Arg Arg Ala Pro Gln Tyr Thr Glu Ile Asp His

60 65 70

Lys Gly Ile Pro Thr Leu Val Glu Val Val Arg Ala Gly Phe Tyr Leu
75 80 85

Gly Phe His Asn Lys Glu Leu Asn Glu Ile Asn Lys Arg Ser Phe Lys
90 95 100

Glu Arg Val Ile Pro Ser Ile Leu Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe
105 110 115 120

Lys Leu Gly Thr Glu Val Gln Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Gly Leu
125 130 135

Leu Ala Gly Asn Glu Thr Ala Pro Pro Glu Val Val Asn Asn Phe Thr
140 145 150

Pro Ile Leu Gln Asp Cys Ile Lys Asn Ile Asp Arg Tyr Ala Leu Asp
155 160 165

Asp Leu Lys Ser Lys Ala Leu Phe Asn Val Leu Ala Ala Pro Thr Tyr
170 175 180

Asp Ile Thr Glu Tyr Leu Arg Ala Thr Lys Glu Lys Pro Glu Asn Thr
185 190 195 200

Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Gly Phe Ile Asn Glu Leu Lys Lys Leu
205 210 215

Ala Leu Tyr Gly Lys Ile Asn Asp Asn Asn Ser Trp Ile Ile Asp Asn
220 225 230

Gly Ile Tyr His Ile Ala Pro Leu Gly Lys Leu His Ser Asn Asn Lys
235 240 245

Ile Gly Ile Glu Thr Leu Thr Glu Val Met Lys Val Tyr Pro Tyr Leu
 250 255 260

Ser Met Gln His Leu Gln Ser Ala Asp Gln Ile Lys Arg His Tyr Asp
 265 270 275 280

Ser Lys Asp Ala Glu Gly Asn Lys Ile Pro Leu Asp Lys Phe Lys Lys
 285 290 295

Glu Gly Lys Glu Lys Tyr Cys Pro Lys Thr Tyr Thr Phe Asp Asp Gly
 300 305 310

Lys Val Ile Ile Lys Ala Gly Ala Arg Val Glu Glu Glu Lys Val Lys
 315 320 325

Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Lys Glu Val Asn Ser Gln Phe Phe Arg Val
 330 335 340

Tyr Gly Ile Asp Lys Pro Leu Glu Glu Gly Asn Pro Asp Asp Ile Leu
 345 350 355 360

Thr Met Val Ile Tyr Asn Ser Pro Glu Glu Tyr Lys Leu Asn Ser Val
 365 370 375

Leu Tyr Gly Tyr Asp Thr Asn Asn Gly Gly Met Tyr Ile Glu Pro Glu
 380 385 390

Gly Thr Phe Phe Thr Tyr Glu Arg Glu Ala Gln Glu Ser Thr Tyr Thr
 395 400 405

Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr His Tyr Leu Gln Gly Arg
 410 415 420

Tyr Ala Val Pro Gly Gln Trp Gly Arg Thr Lys Leu Tyr Asp Asn Asp

425 430 435 440
 Arg Leu Thr Trp Tyr Glu Glu Gly Gly Ala Glu Leu Phe Ala Gly Ser
 445 450 455
 Thr Arg Thr Ser Gly Ile Leu Pro Arg Lys Ser Ile Val Ser Asn Ile
 460 465 470
 His Asn Thr Thr Arg Asn Asn Arg Tyr Lys Leu Ser Asp Thr Val His
 475 480 485
 Ser Lys Tyr Gly Ala Ser Phe Glu Phe Tyr Asn Tyr Ala Cys Met Phe
 490 495 500
 Met Asp Tyr Met Tyr Asn Lys Asp Met Gly Ile Leu Asn Lys Leu Asn
 505 510 515 520
 Asp Leu Ala Lys Asn Asn Asp Val Asp Gly Tyr Asp Asn Tyr Ile Arg
 525 530 535
 Asp Leu Ser Ser Asn Tyr Ala Leu Asn Asp Lys Tyr Gln Asp His Met
 540 545 550
 Gln Glu Arg Ile Asp Asn Tyr Glu Asn Leu Thr Val Pro Phe Val Ala
 555 560 565
 Asp Asp Tyr Leu Val Arg His Ala Tyr Lys Asn Pro Asn Glu Ile Tyr
 570 575 580
 Ser Glu Ile Ser Glu Val Ala Lys Leu Lys Asp Ala Lys Ser Glu Val
 585 590 595 600
 Lys Lys Ser Gln Tyr Phe Ser Thr Phe Thr Leu Arg Gly Ser Tyr Thr
 605 610 615

Gly Gly Ala Ser Lys Gly Lys Leu Glu Asp Gln Lys Ala Met Asn Lys
620 625 630

Phe Ile Asp Asp Ser Leu Lys Lys Leu Asp Thr Tyr Ser Trp Ser Gly
635 640 645

Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr Asn Tyr Lys Val Asp Ser Ser
650 655 660

Asn Arg Val Thr Tyr Asp Val Val Phe His Gly Tyr Leu Pro Asn Glu
665 670 675 680

Gly Asp Ser Lys Asn Ser Leu Pro Tyr Gly Lys Ile Asn Gly Thr Tyr
685 690 695

Lys Gly Thr Glu Lys Glu Lys Ile Lys Phe Ser Ser Glu Gly Ser Phe
700 705 710

Asp Pro Asp Gly Lys Ile Val Ser Tyr Glu Trp Asp Phe Gly Asp Gly
715 720 725

Asn Lys Ser Asn Glu Glu Asn Pro Glu His Ser Tyr Asp Lys Val Gly
730 735 740

Thr Tyr Thr Val Lys Leu Lys Val Thr Asp Asp Lys Gly Glu Ser Ser
745 750 755 760

Val Ser Thr Thr Thr Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ser Glu Asn Lys Leu
765 770 775

Pro Val Ile Tyr Met His Val Pro Lys Ser Gly Ala Leu Asn Gln Lys
780 785 790

Val Val Phe Tyr Gly Lys Gly Thr Tyr Asp Pro Asp Gly Ser Ile Ala

795 800 805

Gly Tyr Gln Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Asp Phe Ser Ser Glu Gln
 810 815 820

Asn Pro Ser His Val Tyr Thr Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Val Thr Leu
 825 830 835 840

Arg Val Met Asp Ser Ser Gly Gln Met Ser Glu Lys Thr Met Lys Ile
 845 850 855

Lys Ile Thr Asp Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro Asn
 860 865 870

Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro Val
 875 880 885

Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp
 890 895 900

Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr
 905 910 915 920

Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val Ser
 925 930 935

Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp
 940 945 950

Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr
 955 960 965

Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Ser Arg
 970 975 980

<212> PRT
 <213> *Clostridium histolyticum*

5 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (-40)..(-1)

10 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(994)

<400> 7

Met Lys Arg Lys Cys Leu Ser Lys Arg Leu Met Leu Ala Ile Thr Met
 -40 -35 -30 -25

Ala Thr Ile Phe Thr Val Asn Ser Thr Leu Pro Ile Tyr Ala Ala Val
 -20 -15 -10

Asp Lys Asn Asn Ala Thr Ala Ala Val Gln Asn Glu Ser Lys Arg Tyr
 -5 -1 1 5

Thr Val Ser Tyr Leu Lys Thr Leu Asn Tyr Tyr Asp Leu Val Asp Leu
 10 15 20

Leu Val Lys Thr Glu Ile Glu Asn Leu Pro Asp Leu Phe Gln Tyr Ser
 25 30 35 40

Ser Asp Ala Lys Glu Phe Tyr Gly Asn Lys Thr Arg Met Ser Phe Ile
 45 50 55

Met Asp Glu Ile Gly Arg Arg Ala Pro Gln Tyr Thr Glu Ile Asp His
 60 65 70

Lys Gly Ile Pro Thr Leu Val Glu Val Val Arg Ala Gly Phe Tyr Leu
 75 80 85

Gly Phe His Asn Lys Glu Leu Asn Glu Ile Asn Lys Arg Ser Phe Lys
90 95 100

Glu Arg Val Ile Pro Ser Ile Leu Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe
105 110 115 120

Lys Leu Gly Thr Glu Val Gln Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Gly Leu
125 130 135

Leu Ala Gly Asn Glu Thr Ala Pro Pro Glu Val Val Asn Asn Phe Thr
140 145 150

Pro Ile Leu Gln Asp Cys Ile Lys Asn Ile Asp Arg Tyr Ala Leu Asp
155 160 165

Asp Leu Lys Ser Lys Ala Leu Phe Asn Val Leu Ala Ala Pro Thr Tyr
170 175 180

Asp Ile Thr Glu Tyr Leu Arg Ala Thr Lys Glu Lys Pro Glu Asn Thr
185 190 195 200

Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Gly Phe Ile Asn Glu Leu Lys Lys Leu
205 210 215

Ala Leu Tyr Gly Lys Ile Asn Asp Asn Asn Ser Trp Ile Ile Asp Asn
220 225 230

Gly Ile Tyr His Ile Ala Pro Leu Gly Lys Leu His Ser Asn Asn Lys
235 240 245

Ile Gly Ile Glu Thr Leu Thr Glu Val Met Lys Val Tyr Pro Tyr Leu
250 255 260

Ser Met Gln His Leu Gln Ser Ala Asp Gln Ile Lys Arg His Tyr Asp
 265 270 275 280

Ser Lys Asp Ala Glu Gly Asn Lys Ile Pro Leu Asp Lys Phe Lys Lys
 285 290 295

Glu Gly Lys Glu Lys Tyr Cys Pro Lys Thr Tyr Thr Phe Asp Asp Gly
 300 305 310

Lys Val Ile Ile Lys Ala Gly Ala Arg Val Glu Glu Glu Lys Val Lys
 315 320 325

Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Lys Glu Val Asn Ser Gln Phe Phe Arg Val
 330 335 340

Tyr Gly Ile Asp Lys Pro Leu Glu Glu Gly Asn Pro Asp Asp Ile Leu
 345 350 355 360

Thr Met Val Ile Tyr Asn Ser Pro Glu Glu Tyr Lys Leu Asn Ser Val
 365 370 375

Leu Tyr Gly Tyr Asp Thr Asn Asn Gly Gly Met Tyr Ile Glu Pro Glu
 380 385 390

Gly Thr Phe Phe Thr Tyr Glu Arg Glu Ala Gln Glu Ser Thr Tyr Thr
 395 400 405

Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr His Tyr Leu Gln Gly Arg
 410 415 420

Tyr Ala Val Pro Gly Gln Trp Gly Arg Thr Lys Leu Tyr Asp Asn Asp
 425 430 435 440

Arg Leu Thr Trp Tyr Glu Glu Gly Gly Ala Glu Leu Phe Ala Gly Ser
 445 450 455

Thr Arg Thr Ser Gly Ile Leu Pro Arg Lys Ser Ile Val Ser Asn Ile
460 465 470

His Asn Thr Thr Arg Asn Asn Arg Tyr Lys Leu Ser Asp Thr Val His
475 480 485

Ser Lys Tyr Gly Ala Ser Phe Glu Phe Tyr Asn Tyr Ala Cys Met Phe
490 495 500

Met Asp Tyr Met Tyr Asn Lys Asp Met Gly Ile Leu Asn Lys Leu Asn
505 510 515 520

Asp Leu Ala Lys Asn Asn Asp Val Asp Gly Tyr Asp Asn Tyr Ile Arg
525 530 535

Asp Leu Ser Ser Asn Tyr Ala Leu Asn Asp Lys Tyr Gln Asp His Met
540 545 550

Gln Glu Arg Ile Asp Asn Tyr Glu Asn Leu Thr Val Pro Phe Val Ala
555 560 565

Asp Asp Tyr Leu Val Arg His Ala Tyr Lys Asn Pro Asn Glu Ile Tyr
570 575 580

Ser Glu Ile Ser Glu Val Ala Lys Leu Lys Asp Ala Lys Ser Glu Val
585 590 595 600

Lys Lys Ser Gln Tyr Phe Ser Thr Phe Thr Leu Arg Gly Ser Tyr Thr
605 610 615

Gly Gly Ala Ser Lys Gly Lys Leu Glu Asp Gln Lys Ala Met Asn Lys
620 625 630

Phe Ile Asp Asp Ser Leu Lys Lys Leu Asp Thr Tyr Ser Trp Ser Gly
635 640 645

Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr Asn Tyr Lys Val Asp Ser Ser
650 655 660

Asn Arg Val Thr Tyr Asp Val Val Phe His Gly Tyr Leu Pro Asn Glu
665 670 675 680

Gly Asp Ser Lys Asn Ser Leu Pro Tyr Gly Lys Ile Asn Gly Thr Tyr
685 690 695

Lys Gly Thr Glu Lys Glu Lys Ile Lys Phe Ser Ser Glu Gly Ser Phe
700 705 710

Asp Pro Asp Gly Lys Ile Val Ser Tyr Glu Trp Asp Phe Gly Asp Gly
715 720 725

Asn Lys Ser Asn Glu Glu Asn Pro Glu His Ser Tyr Asp Lys Val Gly
730 735 740

Thr Tyr Thr Val Lys Leu Lys Val Thr Asp Asp Lys Gly Glu Ser Ser
745 750 755 760

Val Ser Thr Thr Thr Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ser Glu Asn Lys Leu
765 770 775

Pro Val Ile Tyr Met His Val Pro Lys Ser Gly Ala Leu Asn Gln Lys
780 785 790

Val Val Phe Tyr Gly Lys Gly Thr Tyr Asp Pro Asp Gly Ser Ile Ala
795 800 805

Gly Tyr Gln Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Asp Phe Ser Ser Glu Gln
810 815 820

Asn Pro Ser His Val Tyr Thr Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Val Thr Leu
 825 830 835 840

Arg Val Met Asp Ser Ser Gly Gln Met Ser Glu Lys Thr Met Lys Ile
 845 850 855

Lys Ile Thr Asp Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro Asn
 860 865 870

Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro Val
 875 880 885

Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp
 890 895 900

Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr
 905 910 915 920

Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val Ser
 925 930 935

Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp
 940 945 950

Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr
 955 960 965

Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Ser Arg Lys Leu Ala
 970 975 980

Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 985 990

<210> 8
 <211> 3105
 <212> ADN
 <213> *Clostridium histolyticum*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(3105)

5 <400> 8

atg aaa agg aaa tgt tta tct aaa agg ctt atg tta gct ata aca atg 48
 Met Lys Arg Lys Cys Leu Ser Lys Arg Leu Met Leu Ala Ile Thr Met
 1 5 10 15

gct aca ata ttt aca gtg aac agt aca tta cca att tat gca gct gta 96
 Ala Thr Ile Phe Thr Val Asn Ser Thr Leu Pro Ile Tyr Ala Ala Val
 20 25 30

gat aaa aat aat gca aca gca gct gta caa aat gaa agt aag agg tat 144
 Asp Lys Asn Asn Ala Thr Ala Ala Val Gln Asn Glu Ser Lys Arg Tyr
 35 40 45

aca gta tca tat tta aag act tta aat tat tat gac tta gta gat ttg 192
 Thr Val Ser Tyr Leu Lys Thr Leu Asn Tyr Tyr Asp Leu Val Asp Leu
 50 55 60

ctt gtt aag act gaa att gag aat tta cca gac ctt ttt cag tat agt 240
 Leu Val Lys Thr Glu Ile Glu Asn Leu Pro Asp Leu Phe Gln Tyr Ser
 65 70 75 80

tca gat gca aaa gag ttc tat gga aat aaa act cgt atg agc ttt atc 288
 Ser Asp Ala Lys Glu Phe Tyr Gly Asn Lys Thr Arg Met Ser Phe Ile
 85 90 95

atg gat gaa att ggt aga agg gca cct cag tat aca gag ata gat cat 336
 Met Asp Glu Ile Gly Arg Arg Ala Pro Gln Tyr Thr Glu Ile Asp His
 100 105 110

aaa ggt att cct act tta gta gaa gtt gta aga gct gga ttt tac tta 384
 Lys Gly Ile Pro Thr Leu Val Glu Val Val Arg Ala Gly Phe Tyr Leu
 115 120 125

gga ttc cat aac aag gaa ttg aat gaa ata aac aag agg tct ttt aaa 432
 Gly Phe His Asn Lys Glu Leu Asn Glu Ile Asn Lys Arg Ser Phe Lys
 130 135 140

gaa agg gta ata cct tet ata tta gca att caa aaa aat cct aat ttt 480
 Glu Arg Val Ile Pro Ser Ile Leu Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe
 145 150 155 160

aaa cta ggt act gaa gtt caa gat aaa ata gta tct gca aca gga ctt 528
 Lys Leu Gly Thr Glu Val Gln Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Gly Leu
 165 170 175

tta gct ggt aat gaa aca gcg cct cca gaa gtt gta aat aat ttt aca 576
 Leu Ala Gly Asn Glu Thr Ala Pro Pro Glu Val Val Asn Asn Phe Thr
 180 185 190

cca ata ctt caa gac tgt ata aag aat ata gac aga tac gct ctt gat 624
 Pro Ile Leu Gln Asp Cys Ile Lys Asn Ile Asp Arg Tyr Ala Leu Asp
 195 200 205

gat tta aag tca aaa gca tta ttt aat gtt tta gct gca cct acc tat 672
 Asp Leu Lys Ser Lys Ala Leu Phe Asn Val Leu Ala Ala Pro Thr Tyr
 210 215 220

gat ata act gag tat tta aga gct act aaa gaa aaa cca gaa aac act 720
 Asp Ile Thr Glu Tyr Leu Arg Ala Thr Lys Glu Lys Pro Glu Asn Thr
 225 230 235 240

cct tgg tat ggt aaa ata gat ggg ttt ata aat gaa ctt aaa aag tta 768
 Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Gly Phe Ile Asn Glu Leu Lys Lys Leu
 245 250 255

gct ctt tat gga aaa ata aat gat aat aac tct tgg ata ata gat aac 816
 Ala Leu Tyr Gly Lys Ile Asn Asp Asn Asn Ser Trp Ile Ile Asp Asn
 260 265 270

ggt ata tat cat ata gca cct tta ggg aag tta cat agc aat aat aaa 864
 Gly Ile Tyr His Ile Ala Pro Leu Gly Lys Leu His Ser Asn Asn Lys
 275 280 285

ata gga ata gaa act tta aca gag gtt atg aaa gtt tat cct tat tta 912
 Ile Gly Ile Glu Thr Leu Thr Glu Val Met Lys Val Tyr Pro Tyr Leu
 290 295 300

agt atg caa cat tta caa tca gca gat caa att aag cgt cat tat gat 960
 Ser Met Gln His Leu Gln Ser Ala Asp Gln Ile Lys Arg His Tyr Asp
 305 310 315 320

tca aaa gat gct gaa gga aac aaa ata cct tta gat aag ttt aaa aag 1008
 Ser Lys Asp Ala Glu Gly Asn Lys Ile Pro Leu Asp Lys Phe Lys Lys

325	330	335	
gaa gga aaa gaa aaa tac tgt cca aaa act tat aca ttt gat gat gga 1056			
Glu Gly Lys Glu Lys Tyr Cys Pro Lys Thr Tyr Thr Phe Asp Asp Gly			
340	345	350	
aaa gta ata ata aaa gct ggt gct aga gta gaa gaa gaa aaa gtt aaa 1104			
Lys Val Ile Ile Lys Ala Gly Ala Arg Val Glu Glu Glu Lys Val Lys			
355	360	365	
aga cta tac tgg gca tca aag gaa gtt aac tct caa ttc ttt aga gta 1152			
Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Lys Glu Val Asn Ser Gln Phe Phe Arg Val			
370	375	380	
tac gga ata gac aaa cca tta gaa gaa ggt aat cca gat gat ata tta 1200			
Tyr Gly Ile Asp Lys Pro Leu Glu Glu Gly Asn Pro Asp Asp Ile Leu			
385	390	395	400
aca atg gtt atc tac aac agt ccc gaa gaa tat aaa ctc aat agt gtt 1248			
Thr Met Val Ile Tyr Asn Ser Pro Glu Glu Tyr Lys Leu Asn Ser Val			
405	410	415	
cta tac gga tat gat act aat aat ggt ggt atg tat ata gag cca gaa 1296			
Leu Tyr Gly Tyr Asp Thr Asn Asn Gly Gly Met Tyr Ile Glu Pro Glu			
420	425	430	
gga act ttc ttc acc tat gaa aga gaa gct caa gaa agc aca tac aca 1344			
Gly Thr Phe Phe Thr Tyr Glu Arg Glu Ala Gln Glu Ser Thr Tyr Thr			
435	440	445	
tta gaa gaa tta ttt aga cat gaa tat aca cat tat ttg caa gga aga 1392			
Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr His Tyr Leu Gln Gly Arg			
450	455	460	
tat gca gtt cca gga caa tgg gga aga aca aaa ctt tat gac aat gat 1440			
Tyr Ala Val Pro Gly Gln Trp Gly Arg Thr Lys Leu Tyr Asp Asn Asp			
465	470	475	480
aga tta act tgg tat gaa gaa ggt gga gca gaa tta ttt gca ggt tct 1488			
Arg Leu Thr Trp Tyr Glu Glu Gly Gly Ala Glu Leu Phe Ala Gly Ser			
485	490	495	
act aga act tct gga ata tta cca aga aag agt ata gta tca aat att 1536			
Thr Arg Thr Ser Gly Ile Leu Pro Arg Lys Ser Ile Val Ser Asn Ile			
500	505	510	

cat aat aca aca aga aat aat aga tat aag ctt tca gac act gta cat 1584
 His Asn Thr Thr Arg Asn Asn Arg Tyr Lys Leu Ser Asp Thr Val His
 515 520 525

tct aaa tat ggt gct agt ttt gaa ttc tat aat tat gca tgt atg ttt 1632
 Ser Lys Tyr Gly Ala Ser Phe Glu Phe Tyr Asn Tyr Ala Cys Met Phe
 530 535 540

atg gat tat atg tat aat aaa gat atg ggt ata tta aat aaa cta aat 1680
 Met Asp Tyr Met Tyr Asn Lys Asp Met Gly Ile Leu Asn Lys Leu Asn
 545 550 555 560

gat ctt gca aaa aat aat gat gtt gat gga tat gat aat tat att aga 1728
 Asp Leu Ala Lys Asn Asn Asp Val Asp Gly Tyr Asp Asn Tyr Ile Arg
 565 570 575

gat tta agt tct aat tat gct tta aat gat aaa tat caa gat cat atg 1776
 Asp Leu Ser Ser Asn Tyr Ala Leu Asn Asp Lys Tyr Gln Asp His Met
 580 585 590

cag gag cgc ata gat aat tat gaa aat tta aca gtg cct ttt gta gct 1824
 Gln Glu Arg Ile Asp Asn Tyr Glu Asn Leu Thr Val Pro Phe Val Ala
 595 600 605

gat gat tat tta gta agg cat gct tat aag aac cct aat gaa att tat 1872
 Asp Asp Tyr Leu Val Arg His Ala Tyr Lys Asn Pro Asn Glu Ile Tyr
 610 615 620

tct gaa ata tct gaa gta gca aaa tta aag gat gct aag agt gaa gtt 1920
 Ser Glu Ile Ser Glu Val Ala Lys Leu Lys Asp Ala Lys Ser Glu Val
 625 630 635 640

aag aaa tca caa tat ttt agt acc ttt act ttg aga ggt agt tac aca 1968
 Lys Lys Ser Gln Tyr Phe Ser Thr Phe Thr Leu Arg Gly Ser Tyr Thr
 645 650 655

ggt gga gca tct aag ggg aaa tta gaa gat caa aaa gca atg aat aag 2016
 Gly Gly Ala Ser Lys Gly Lys Leu Glu Asp Gln Lys Ala Met Asn Lys
 660 665 670

ttt ata gat gat tca ctt aag aaa tta gat acg tat tct tgg agt ggg 2064
 Phe Ile Asp Asp Ser Leu Lys Lys Leu Asp Thr Tyr Ser Trp Ser Gly
 675 680 685

tat aaa act tta act gct tat ttc act aat tat aaa gtt gac tct tca 2112
 Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr Asn Tyr Lys Val Asp Ser Ser

690	695	700	
aat aga gtt act tat gat gta gta ttc cac gga tat tta cca aac gaa 2160			
Asn Arg Val Thr Tyr Asp Val Val Phe His Gly Tyr Leu Pro Asn Glu			
705	710	715	720
ggt gat tcc aaa aat tca tta cct tat ggc aag atc aat gga act tac 2208			
Gly Asp Ser Lys Asn Ser Leu Pro Tyr Gly Lys Ile Asn Gly Thr Tyr			
	725	730	735
aag gga aca gag aaa gaa aaa atc aaa ttc tct agt gaa ggc tct ttc 2256			
Lys Gly Thr Glu Lys Glu Lys Ile Lys Phe Ser Ser Glu Gly Ser Phe			
	740	745	750
gat cca gat ggt aaa ata gtt tct tat gaa tgg gat ttc gga gat ggt 2304			
Asp Pro Asp Gly Lys Ile Val Ser Tyr Glu Trp Asp Phe Gly Asp Gly			
	755	760	765
aat aag agt aat gag gaa aat cca gag cat tca tat gac aag gta gga 2352			
Asn Lys Ser Asn Glu Glu Asn Pro Glu His Ser Tyr Asp Lys Val Gly			
	770	775	780
act tat aca gtg aaa tta aaa gtt act gat gac aag gga gaa tct tca 2400			
Thr Tyr Thr Val Lys Leu Lys Val Thr Asp Asp Lys Gly Glu Ser Ser			
785	790	795	800
gta tct act act act gca gaa ata aag gat ctt tca gaa aat aaa ctt 2448			
Val Ser Thr Thr Thr Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ser Glu Asn Lys Leu			
	805	810	815
cca gtt ata tat atg cat gta cct aaa tcc gga gcc tta aat caa aaa 2496			
Pro Val Ile Tyr Met His Val Pro Lys Ser Gly Ala Leu Asn Gln Lys			
	820	825	830
gtt gtt ttc tat gga aaa gga aca tat gac cca gat gga tct atc gca 2544			
Val Val Phe Tyr Gly Lys Gly Thr Tyr Asp Pro Asp Gly Ser Ile Ala			
	835	840	845
gga tat caa tgg gac ttt ggt gat gga agt gat ttt agc agt gaa caa 2592			
Gly Tyr Gln Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Asp Phe Ser Ser Glu Gln			
	850	855	860
aac cca agc cat gta tat act aaa aaa ggt gaa tat act gta aca tta 2640			
Asn Pro Ser His Val Tyr Thr Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Val Thr Leu			
865	870	875	880

aga gta atg gat agt agt gga caa atg agt gaa aaa act atg aag att 2688
 Arg Val Met Asp Ser Ser Gly Gln Met Ser Glu Lys Thr Met Lys Ile
 885 890 895

aag att aca gat ccg gta tat cca ata ggc act gaa aaa gaa cca aat 2736
 Lys Ile Thr Asp Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro Asn
 900 905 910

aac agt aaa gaa act gca agt ggt cca ata gta cca ggt ata cct gtt 2784
 Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro Val
 915 920 925

agt gga acc ata gaa aat aca agt gat caa gat tat ttc tat ttt gat 2832
 Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp
 930 935 940

gtt ata aca cca gga gaa gta aaa ata gat ata aat aaa tta ggg tac 2880
 Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr
 945 950 955 960

gga gga gct act tgg gta gta tat gat gaa aat aat aat gca gta tct 2928
 Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val Ser
 965 970 975

tat gcc act gat gat ggg caa aat tta agt gga aag ttt aag gca gat 2976
 Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp
 980 985 990

aaa cca ggt aga tat tac atc cat ctt tac atg ttt aat ggt agt tat 3024
 Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr
 995 1000 1005

atg cca tat aga att aat ata gaa ggt tca gta tct aga aag ctt 3069
 Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Ser Arg Lys Leu
 1010 1015 1020

gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac tga 3105
 Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 1025 1030

<210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Un cebador para PCR (colG-F)

<400> 9

5

10

ES 2 531 402 T3

atgaaaaaaa atatttaaa gattc 25

5 <210> 10
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Un cebador para PCR (colG-R)

<400> 10
ccggatccta tctagatacc cttact 27

15 <210> 11
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Un cebador para PCR (His-F)

<400> 11
gctctagaaa gcttgcgcc gcactcga 28

25 <210> 12
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Un cebador para PCR (His-R)

35 <400> 12
cgggatccgg atatagtcc tcct 24

40 <210> 13
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Un cebador para PCR (lac-F)

<400> 13
cgggaagct tgccaatac gcaaaccg 28

50 <210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> Un cebador para PCR (lac-R)

<400> 14
agctgttcc tgttgaa 18

60 <210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

65 <220>
<223> Un cebador para PCR (colH-F)

<400> 15

ES 2 531 402 T3

atgaaaagga aatgtttatc 20

<210> 16

<211> 27

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Un cebador para PCR (colH-R)

<400> 16

ccggatccta tctagatact gaacctt 27

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una colagenasa de fusión,
en el que:

5 un cultivo obtenido mediante el cultivo de *E. coli* transformada por uno cualquiera de un ADN que codifica la colagenasa de fusión y un vector de expresión que comprende el ADN se purifica mediante cromatografía por afinidad que corresponde a una marca de afinidad para recoger de ese modo de forma selectiva la colagenasa de fusión que tiene un dominio de unión a colágeno, en donde la colagenasa de fusión tiene las siguientes características (i) a (ii):

- (i) la marca de afinidad se une directa o indirectamente a un extremo carboxilo de la colagenasa;
- (ii) la colagenasa se selecciona entre los siguientes (a) a (h):

- 15 (a) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a 1008 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2;
- (b) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a 1008 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2 en la que se suprimen, sustituyen, insertan o añaden de 1 a 30 aminoácidos;
- 20 (c) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de un 80 % o superior con la secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a 1008 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2;
- (d) una colagenasa en la que una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a -1 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 1 y 2 se retira de una cualquiera de las colagenasas que se han descrito en
- 25 (a) a (c);
- (e) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a 981 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6;
- (f) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a 981 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6 en la que se suprimen, sustituyen, insertan o añaden de 1 a 30 aminoácidos;
- 30 (g) una colagenasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de un 80 % o superior con la secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a 981 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6;
- (h) una colagenasa en la que una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a -1 de una cualquiera de las SEC ID N^o: 5 y 6 se retira de una cualquiera de las colagenasas que se han descrito en (e) a (g).

2. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la colagenasa de fusión es una colagenasa de fusión en la que la marca de afinidad es dos o más restos de histidina consecutivos.

40 3. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la colagenasa de fusión comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a 1021 de la SEC ID N^o: 3.

45 4. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la colagenasa de fusión es una colagenasa de fusión a partir de la que se retira una secuencia de aminoácidos de las posiciones -110 a -1 de la SEC ID N^o: 3.

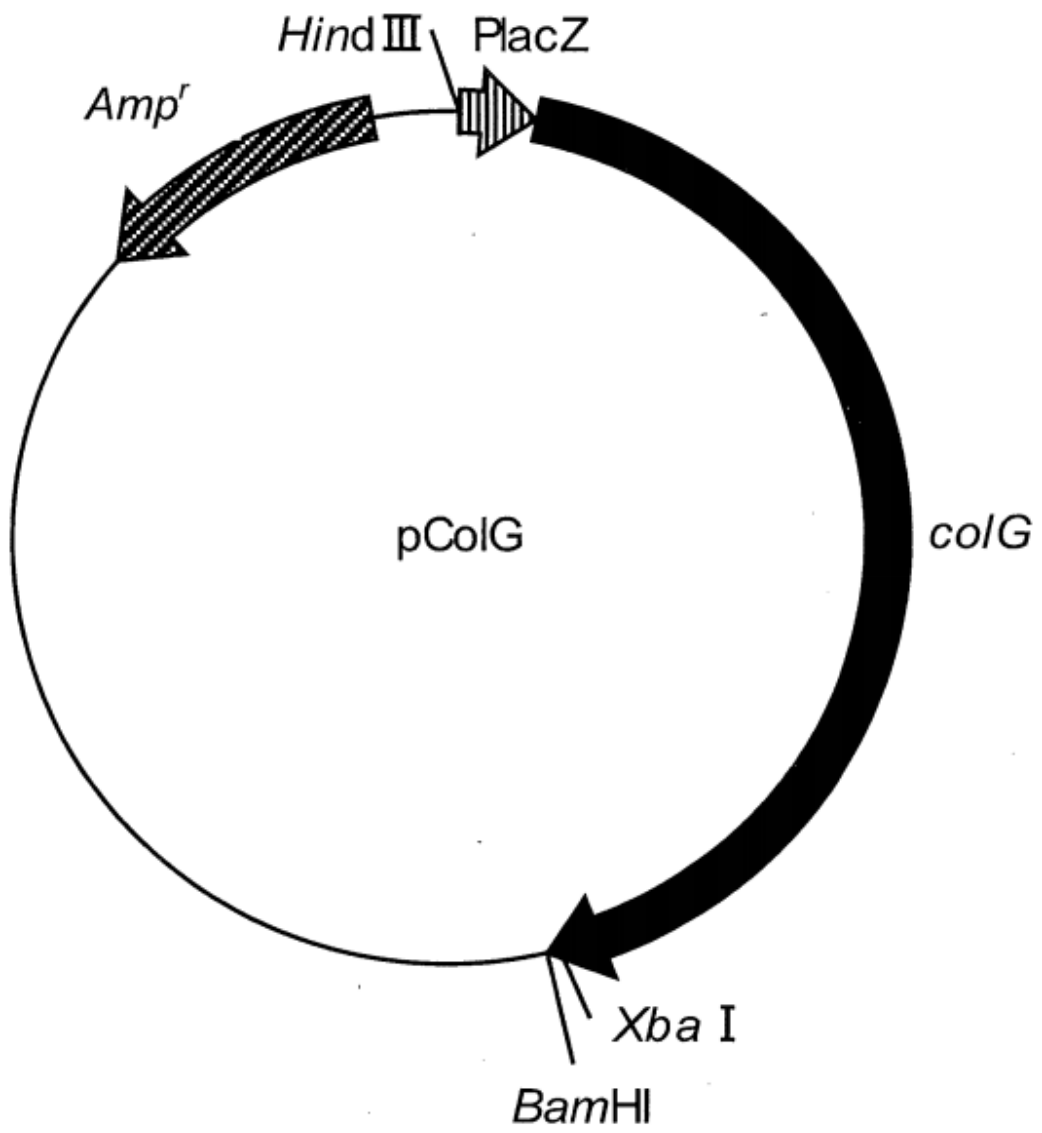
5. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la colagenasa de fusión comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a 994 de la SEC ID N^o: 7.

50 6. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la colagenasa de fusión es una colagenasa de fusión a partir de la que se retira una secuencia de aminoácidos de las posiciones -40 a -1 de la SEC ID N^o: 7.

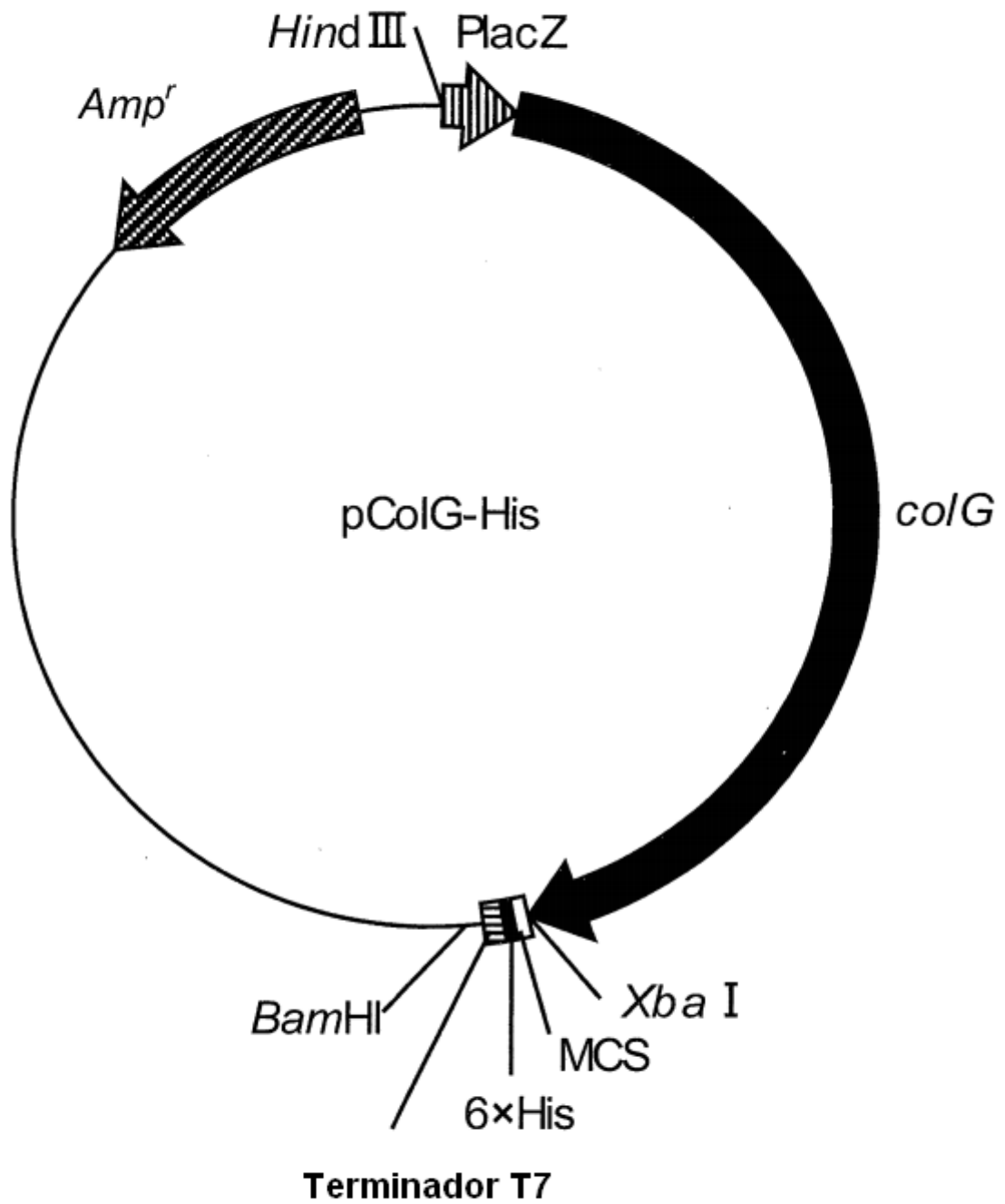
7. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ADN que codifica la colagenasa de fusión es un ADN que comprende una secuencia de bases de las posiciones 1 a 3396 de la SEC ID N^o: 4.

55 8. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ADN que codifica la colagenasa de fusión es un ADN que comprende una secuencia de bases de las posiciones 1 a 3105 de la SEC ID N^o: 8.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



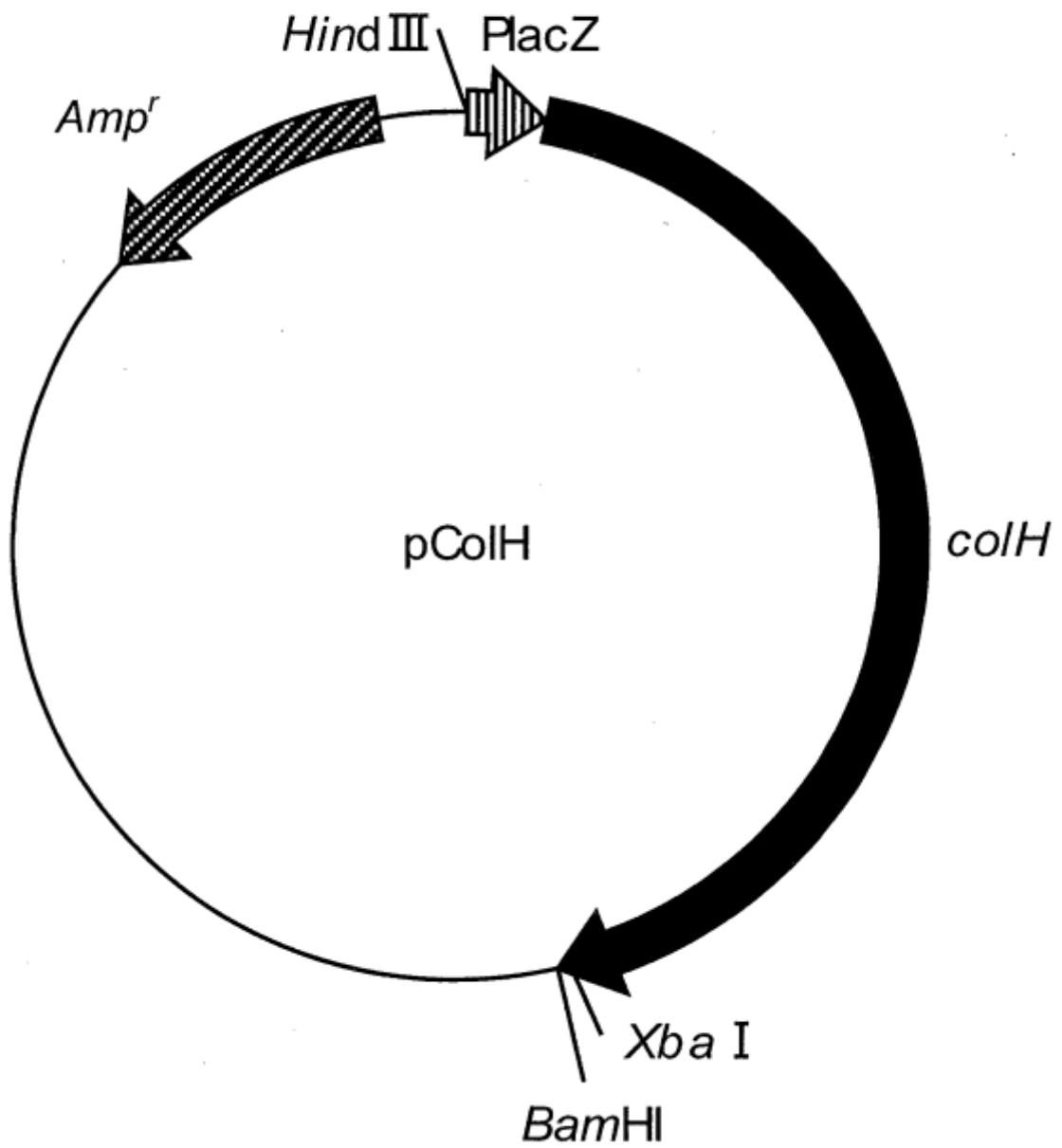
[Fig. 3]



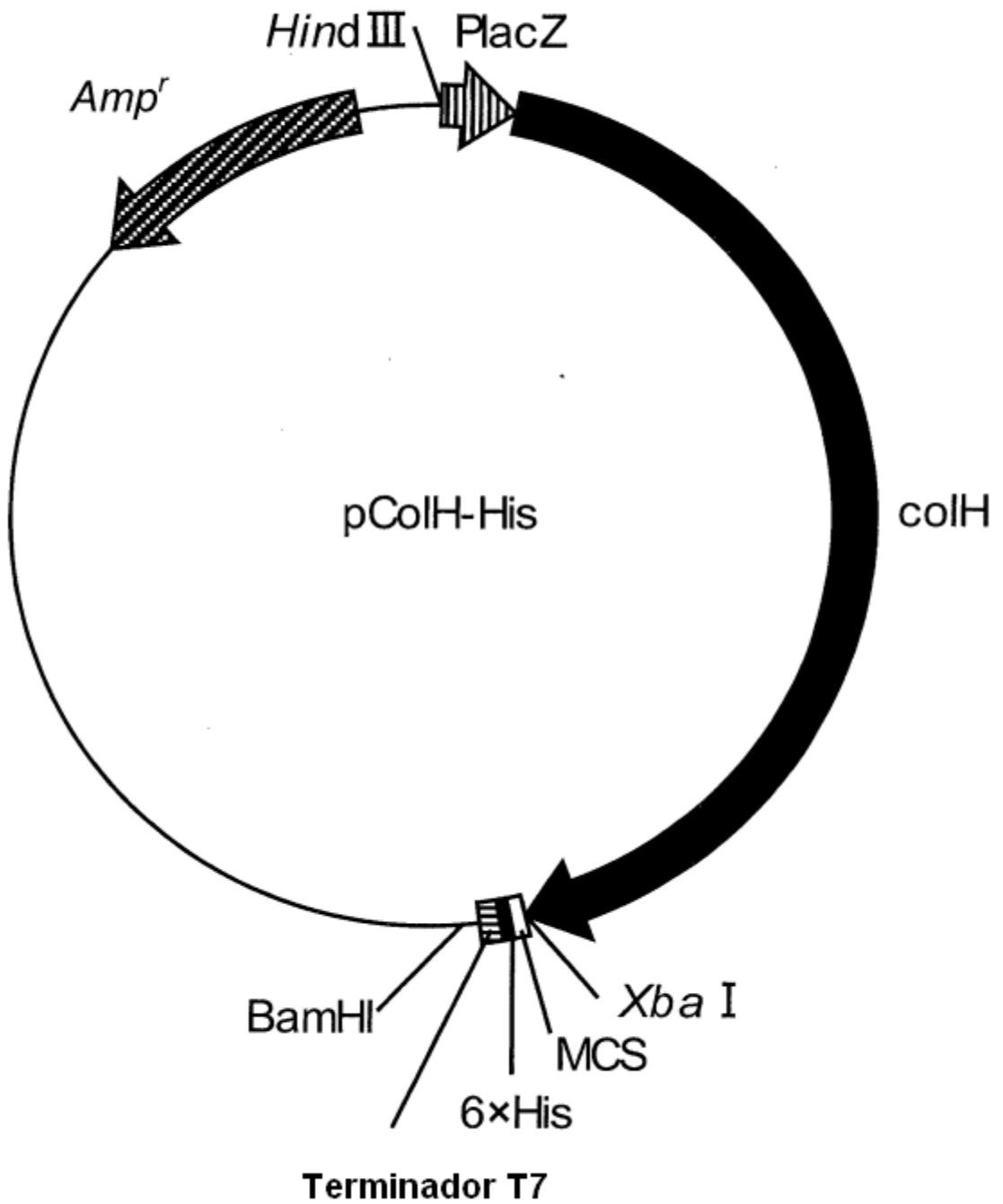
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

