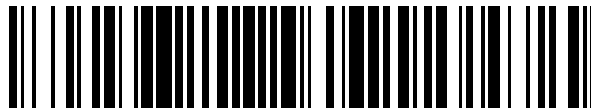


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 646**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/62** (2006.01)

**C12N 9/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02709912 .6**

96 Fecha de presentación: **06.02.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1478761**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2004**

54 Título: **Degradación de plaguicidas y toxinas de ésteres hidrófobos**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.10.2012**

73 Titular/es:  
**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL  
RESEARCH ORGANISATION (100.0%)  
LIMESTONE AVENUE  
CAMPBELL, ACT 2601, AU**

72 Inventor/es:  
**RUSSELL, ROBYN, JOYCE;  
HEIDARI, RAMA;  
DEVONSHIRE, ALAN;  
DORRIAN, SUSAN, JANE y  
OAKESHOTT, JOHN, GRAHAM**

74 Agente/Representante:  
**LEHMANN NOVO, Isabel**

**ES 2 389 646 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

Degradación de plaguicidas y toxinas de ésteres hidrófobos

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a métodos para degradar plaguicidas y toxinas de ésteres hidrófobos. En particular, la presente invención se refiere al uso de esterasas insecticidas, tales como  $\alpha$ -carboxilesterasas, y sus mutantes, en el biorremedio de residuos de piretroides que contaminan el medioambiente y productos básicos de consumo hortícolas.

Antecedentes de la invención

10 Los piretroides constituyen una clase importante de plaguicidas químicos. Son análogos sintéticos de las piretrinas naturales, que son producidas en las flores de la planta de piretro (*Tanacetum cinerariifolium*). La modificación de su estructura ha producido compuestos que retienen la toxicidad intrínsecamente modesta para vertebrados de los productos naturales, pero son más estables y más potentes como plaguicidas. En los años treinta desde su introducción han escalado hasta alrededor de 10-20% de las ventas de insecticidas a nivel mundial, y se proyecta que retengan una cuota de mercado sustancial en el futuro previsible. Ahora se usan ampliamente por sistemas de producción y procesamiento agrícolas en muchos países, y han provocado incidentes debido a los residuos en diversos artículos de consumo que van desde el algodón y la horticultura hasta la madera.

15 Los residuos de plaguicidas de piretroides son contaminantes indeseables del medioambiente y un abanico de artículos de consumo. Son indeseables debido al amplio intervalo de dianas del plaguicida en los invertebrados y su toxicidad significativa para vertebrados, aunque generalmente se considera que están entre los plaguicidas más seguros para los mamíferos. Las áreas de sensibilidad particular incluyen la contaminación del suelo, agua embalsada de irrigación que se recicla, usada por regantes aguas abajo o que simplemente se recoge desde un área de captación de agua sin cosechar y se desvía al área cosechada con fines de irrigación, y residuos por encima de los niveles permisibles en las exportaciones hortícolas. Las industrias de animales también tienen problemas con artículos de consumo contaminados con plaguicidas, que surgen bien a través de su propio uso de plaguicidas o bien su confianza en productos y subproductos de cosechas tal como forraje. Las aguas del procesamiento procedentes de plantas de procesamiento de alimentos, baños de tinte para alfombras y baños de animales también son contaminados, algunas veces de forma bastante excesiva, con residuos de plaguicidas. Por lo tanto, se requieren estrategias de biorremediación para eliminar o reducir estos residuos de plaguicidas.

20 Una estrategia de biorremediación propuesta implica el uso de enzimas capaces de inmovilizar o degradar los residuos de plaguicida. Tales enzimas se pueden emplear, por ejemplo, en biorreactores a través de los cuales se podría hacer pasar agua contaminada, o en disoluciones de lavado después de la desinfestación tras la cosecha de frutas, vegetales o productos de animales, para reducir los niveles de residuos y los tiempos de espera. Las enzimas adecuadas para degradar residuos de plaguicidas incluyen OP hidrolasas de bacterias, vertebrados e insectos resistentes a organofosfatos (OP). Es deseable que las enzimas hidrolíticas degraden los residuos de plaguicidas a una velocidad rápida.

25 La resistencia a organofosfatos en la moscarda carroñera, *Lucilia cuprina*, es conferida por dos mutaciones diferentes en el gen que codifica carboxilesterasa E3. Las dos enzimas mutantes difieren en sus especificidades por el sustrato, pero entre ellas pueden detoxificar dos subtipos principales de OPs. El gen E3 de *L. cuprina* fue clonado por Newcomb et al. (1997), y, usando una combinación de secuenciación de ADN, expresión de baculovirus y mutagénesis *in vitro*, estos investigadores identificaron las dos mutaciones de la resistencia. Una es una sustitución de Asp por Gly en el resto 137 en la región del agujero de oxoanión del sitio activo (Newcomb et al., 1997). La otra es una sustitución de Leu por Trp en el resto 251 en la región de unión al sustrato (Campbell et al., 1998), que da como resultado un incremento en la actividad de malatión carboxilesterasa, así como la adquisición de actividad de OP hidrolasa.

30 Existe la necesidad de métodos y enzimas que se pueden usar para la biorremediación de, por ejemplo, suelos, productos alimentarios y muestras de agua contaminados con plaguicidas y toxinas de ésteres hidrófobos.

Sumario de la invención

35 Se ha encontrado ahora que las esterasas de insecto, y mutantes de las mismas, son capaces de hidrolizar plaguicidas y toxinas de ésteres hidrófobos tales como piretroides. La actividad de las esterasas de insecto, y mutantes de las mismas, muestran un grado de especificidad quiral, que difiere entre mutantes. Por lo tanto, es posible proporcionar un juego de esterasas de insecto, o mutantes de las mismas, que son capaces de degradar plaguicidas y toxinas de ésteres hidrófobos que pueden actuar, solas o juntas, como agentes de biorremediación eficaces para plaguicidas y toxinas de ésteres hidrófobos tales como piretroides.

40 En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para eliminar o reducir la concentración de un piretroide en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con una esterasa de insecto, o un mutante de la misma, en el que la esterasa de insecto es una  $\alpha$ -carboxilesterasa, que se

puede aislar de la especie de Diptera. Las enzimas específicas que se encuentran en esta subclave incluyen, pero no se limitan a, las esterases E3 o EST23.

5 En consecuencia, las  $\alpha$ -carboxilesterasas para uso en la presente invención son la E3 esterasa (SEC ID NO: 1), que deriva de *Lucilia cuprina*, o la EST23 esterasa (SEC ID NO: 2), que deriva de *Drosophila melanogaster*, o una secuencia que es al menos 80% idéntica a SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2.

En una realización preferida adicional, la esterasa mutante de insecto tiene una mutación o mutaciones en las regiones del agujero de oxoanión, del bolsillo de unión a acilo o del sitio aniónico del sitio activo, o cualquier combinación de las mismas.

10 En una realización preferida adicional, la  $\alpha$ -carboxilestera mutante se selecciona del grupo que consiste en: E3G137R, E3G137H, E3W251L, E3W251S, E3W251G, E3W251T, E3W251A, E3W251L/F309L, E3W251L/G137D, E3W251L/P250S, E3F309L, E3Y148F, E3E217M, E3F354W, E3F354L, y EST23W251L. Preferiblemente, la  $\alpha$ -carboxilestera mutante es E3W251L, E3F309L, E3W251L/F309L o EST23W251L.

En el primer aspecto, la  $\alpha$ -carboxilestera, o un mutante de la misma, tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 15 i) una secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1,  
 ii) una secuencia como se muestra en SEC ID NO: 2, y  
 iii) una secuencia que es al menos 80% idéntica a i) o ii) que es capaz de hidrolizar un piretroide. Más preferiblemente, el polipéptido es al menos 90% idéntico, más preferiblemente al menos 95% idéntico, e incluso más preferiblemente al menos 97% idéntico a i) o ii).

20 Como sabrá el destinatario experto, el método del primer aspecto se puede llevar a cabo usando más de una esterasa de insecto, o mutantes de la misma. Este es particularmente el caso cuando diferentes esterases de insecto, o mutantes de las mismas, tienen diferente actividad hidrolítica para diferentes estereoisómeros del piretroide.

25 El piretroide puede ser un piretroide de tipo I o tipo II. Preferiblemente, el piretroide de tipo I se selecciona del grupo que consiste en: 1S/1R *trans* permetrina, 1S/1R *cis* permetrina, NRDC157 1S *cis*, y NRDC157 1R *cis*. Preferiblemente, el piretroide de tipo II es deltametrina.

Preferiblemente, la muestra es una muestra de suelo, una muestra de agua o una muestra biológica. Las muestras biológicas preferidas incluyen materia derivada de plantas, tales como semillas, vegetales o frutas, así como materia derivada de animales, tal como carne.

30 Preferiblemente, el método se lleva a cabo en un entorno que contiene líquido.

La muestra se puede exponer a la esterasa de insecto, o un mutante de la misma, por cualquier medio apropiado. Esto incluye proporcionar la esterasa de insecto, o mutante de la misma, directamente a la muestra, con o sin vehículos o excipientes, etc. La esterasa de insecto, o mutante de la misma, también se puede proporcionar en forma de una célula hospedante, típicamente un microorganismo tal como una bacteria o un hongo, que expresa un polinucleótido que codifica la esterasa de insecto, o mutante de la misma.

35 La esterasa de insecto, o mutante de la misma, también se puede proporcionar como una esponja o espuma polimérica, comprendiendo la espuma o esponja la esterasa de insecto, o mutante de la misma, inmovilizada sobre un soporte poroso polimérico.

Preferiblemente, el soporte poroso comprende poliuretano.

40 En una realización preferida, la esponja o espuma comprende además carbono embebido o integrado sobre o en el soporte poroso.

45 Se prevé que el uso de un tensioactivo en el método de la presente invención puede liberar plaguicidas y/o toxinas de ésteres hidrófobos de, por ejemplo, cualquier sedimento en la muestra, incrementando así la eficiencia del método de la presente invención. En consecuencia, en otra realización preferida, el método comprende la presencia de un tensioactivo cuando el plaguicida o toxina de éster hidrófobo se pone en contacto con la esterasa de insecto, o mutante de la misma. Más preferiblemente, el tensioactivo es un biotensioactivo.

Además, el plaguicida o toxina de éster hidrófobo en una muestra también se puede degradar exponiendo la muestra a una planta transgénica que produce la esterasa de insecto, o mutante de la misma.

50 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para seleccionar una enzima que hidroliza un piretroide, comprendiendo el método

(i) introducir una o más mutaciones en la esterasa de insecto de la invención, o una esterasa de insecto que ya se ha mutado, y

(ii) determinar la capacidad de la esterasa mutante de insecto para hidrolizar un piretroide.

5 Preferiblemente, la una o más mutaciones mejora la actividad hidrolítica y/o altera la estereoespecificidad de la esterasa.

Tal una o más mutaciones se pueden introducir mediante una variedad de técnicas conocidas por el destinatario experto. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria, o el uso de transposición de secuencias de ADN en técnicas de evolución *in vitro*, llevándose a cabo cada una de las cuales en un polinucleótido que codifica la esterasa de insecto o la esterasa de insecto que ya se ha mutado.

10 La esterasa de insecto es una  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero. Más preferiblemente, la  $\alpha$ -carboxilesterasa es una E3 o EST23 esterasa. La  $\alpha$ -carboxilesterasa tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

i) una secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1,

ii) una secuencia como se muestra en SEC ID NO: 2, y

15 iii) una secuencia que es al menos 80% idéntica a i) o ii). Más preferiblemente, el polipéptido es al menos 90% idéntico, más preferiblemente al menos 95% idéntico, e incluso más preferiblemente al menos 97% idéntico a i) o ii).

Preferiblemente, la una o más mutaciones están en una región de la esterasa seleccionada del grupo que consiste en: agujero del oxoanión, bolsillo de unión a acilo, y sitio aniónico.

20 En una realización preferida adicional, la esterasa de insecto que ya se ha mutado se selecciona del grupo que consiste en: E3G137R, E3G137H, E3W251L, E3W251S, E3W251G, E3W251T, E3W251A, E3W251L/F309L, E3W251L/G137D, E3W251L/P250S, E3F309L, E3Y148F, E3E217M, E3F354W, E3F354L, y EST23W251L.

En una realización preferida adicional, la mutación es una mutación de punto.

25 A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, implican la inclusión de un elemento, entero o etapa señalado, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

La invención se describe en lo sucesivo por medio del siguiente ejemplo no limitante y con referencia a las figuras que se acompañan.

Breve descripción de los dibujos que se acompañan

30 Figura 1: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las enzimas E3 (SEC ID NO: 1) y de acetilcolinesterasa de *Torpedo californica* (SEC ID NO: 3). La secuencia alrededor de la serina del sitio activo y los restos Gly137, Trp251 y Phe309 se muestran en negrita y subrayados.

Figura 2: Configuración propuesta del sitio activo de LcE3 carboxilesterasa en una reacción de acilación.

35 Figura 3: Resultados de experimentos de titulación representativos llevados a cabo en extractos celulares que contienen esterases expresadas en baculovirus.

Figura 4: Estructuras moleculares para 1R/S *cis* y *trans* permetrina, 1R/S *cis* y *trans* NRDC157, y los cuatro estereoisómeros de *cis* deltrametrina.

Figura 5: Hidrólisis de *cis* y *trans* permetrina (0,5  $\mu$ M) por E3W251L.

Clave para el listado de secuencias

40 SEC ID NO: 1 - Secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -carboxilesterasa E3 de *Lucilia cuprina*.

SEC ID NO: 2 - Secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -carboxilesterasa EST23 de *Drosophila melanogaster*.

SEC ID NO: 3 - Secuencia de aminoácidos parcial de acetilcolinesterasa de *Torpedo californica*.

Descripción detallada de la invención

Técnicas generales

Excepto que se indique de otro modo, las técnicas de ADN recombinante utilizadas en la presente invención son procedimientos estándar, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales técnicas se describen y se explican en la bibliografía en fuentes tales como J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editores), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel et al. (Editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente).

#### Piretroides

Los piretroides son análogos sintéticos de plaguicidas de piretro. Por ejemplo, los piretroides incluyen (en cada caso el nombre común es según *The Pesticide Manual*, 12ª Edición): permetrina, fenvalerato, esfenvalerato, cipermetrina, alfa-cipermetrina, deltametrina, fenpropatrina, fluvalinato, flucitrinato, ciflutrina, acrinatrina, tralometrina, cicloprotrina, lambda-chalotrina, teflutrina, bifentrina, transflutrina, zeta-cipermetrina, y halfenprox.

Los compuestos piretroides de tipo I (por ejemplo, permetrina) difieren de los compuestos piretroides de tipo II en que los compuestos de tipo II poseen un grupo ciano en el átomo de carbono en posición  $\alpha$  del resto fenoxibencilo. Algunos ejemplos de piretroides de tipo II son cipermetrina, deltametrina, y fenvalerato.

Los ejemplos de plaguicidas piretroides que se pueden hidrolizar usando los métodos de la presente invención incluyen, pero no se restringen a estos compuestos: carboxilato de 3-fenoxibencil(1RS)-cis,trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano [permetrina], carboxilato de  $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencil-1-(4-etoxifenil)-2,2-diclorociclopropano [cicloprotrina], (RS)-2-(4-clorofenil)-3-isovalerato de (RS)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencilo [fenvalerato], (S)-2-(4-clorofenil)isovalerato de (S)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencilo [esfenvalerato], (S)-2-(4-difluorometoxifenil)isovalerato de  $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencilo [flucitrinato], 2-(2-cloro-4-trifluorometilaniilino)isovalerato de  $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencilo [fluvalinato], 2,2,3,3-tetrametilciclopropanocarboxilato de (RS)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencilo [fenpropatrina], (1R)-cis,trans-crisantemato de 3-fenoxibencilo [d-fenotrina], (1R)-cis,trans-crisantemato de (RS)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencilo [cifenotrina], (1RS)-cis,trans-crisantemato de (RS)3-alil-2-metil-4-oxociclopento-2-enilo [aletrina], (1R)-cis,trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de  $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencilo [cipermetrina], (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (S)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencilo [deltametrina], (1R)-cis-2,2-dimetil-3-(1,2,2-tetrabromoetil)ciclopropanocarboxilato de (S)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencilo [tralometrina], (1RS)-cis,trans-crisantemato de 3,4,5,6-tetrahidroimidometilo [tetrametrina], (1RS)-cis,trans-crisantemato de 5-bencil-3-furilmetilo [resmetrina], (1R,trans)-2,2-dimetil-3-(2,2-diclorovinil)ciclopropanocarboxilato de  $\alpha$ -ciano-4-fluoro-3-fenoxibencilo [ciflutrina].

#### Polipéptidos

Por "sustancialmente puro" se quiere decir un polipéptido que se ha separado de la mayoría de los lípidos, ácidos nucleicos, otros polipéptidos, y otras moléculas contaminantes con las que está asociado en su estado nativo.

El % de identidad de un polipéptido se determina mediante el análisis de GAP (Needleman y Wunsch, 1970) (programa GCG) con una penalización de creación de salto = 5, y una penalización de extensión de salto = 0,3. La secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 15 aminoácidos, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias a lo largo de una región de al menos 15 aminoácidos. Más preferiblemente, la secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 50 aminoácidos, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias a lo largo de una región de al menos 50 aminoácidos. Más preferiblemente, la secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 100 aminoácidos, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias a lo largo de una región de al menos 100 aminoácidos. Más preferiblemente, la secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 250 aminoácidos, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias a lo largo de una región de al menos 250 aminoácidos. Incluso más preferiblemente, la secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 500 aminoácidos, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias a lo largo de una región de al menos 500 aminoácidos.

Como se usa aquí, la expresión "mutante de la misma" se refiere a mutantes de una esterasa de insecto de origen natural que mantiene al menos cierta actividad hidrolítica frente a pesticida o toxina de éster hidrófobo cuando se compara con la esterasa de insecto natural de la que deriva. Preferiblemente, el mutante tiene actividad mejorada y/o estereoespecificidad alterada cuando se compara con la esterasa de insecto de origen natural de la que deriva.

Los mutantes de secuencias de aminoácidos de esterases de insecto de origen natural se pueden preparar introduciendo cambios nucleótidos apropiados en un ácido nucleico de la presente invención, o mediante síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Tales mutantes incluyen, por ejemplo, supresiones, inserciones o sustituciones de restos en la secuencia de aminoácidos. Se puede obtener una combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar al constructo final, con la condición de que el producto proteico final posea las características deseadas.

A la hora de diseñar los mutantes de secuencias de aminoácidos, la localización del sitio de la mutación y la naturaleza de la mutación dependerán de la característica o características a modificar. En una realización particularmente preferida, las esterases de insecto de origen natural se mutan para incrementar su capacidad para

hidrolizar un plaguicida o toxina de éster hidrófobo, particularmente un piretroide. Los sitios para la mutación se pueden modificar individualmente o en serie, por ejemplo (1) sustituyendo primero con elecciones de aminoácidos conservativas y después con selecciones más radicales, dependiendo de los resultados logrados, (2) suprimiendo el resto diana, o (3) insertando otros restos adyacentes al sitio localizado. Los ejemplos de tales mutantes incluyen:

5

Los mutantes útiles para los métodos de la presente invención también se pueden obtener mediante el uso de la técnica de transposición de secuencias de ADN (Patten et al., 1997). La transposición de secuencias de ADN es un procedimiento para la recombinación y mutación recurrentes, llevada a cabo mediante fragmentación aleatoria de un conjunto de genes relacionados, seguido del reensamblaje de los fragmentos mediante PCR sin cebadores. Generalmente, la transposición de secuencias de ADN proporciona un medio para generar librerías de polinucleótidos que se pueden seleccionar o identificar en busca de, en este caso, polinucleótidos que codifican enzimas que pueden hidrolizar un plaguicida o toxina de éster hidrófobo. También se puede identificar la estereoespecificidad de las enzimas seleccionadas.

10

Las supresiones de secuencias de aminoácidos generalmente oscilan desde alrededor de 1 a 30 restos, más preferiblemente alrededor de 1 a 10 restos, y típicamente alrededor de 1 a 5 restos contiguos.

15

Los mutantes de sustitución tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula polipeptídica que ha sido eliminado y en su lugar se ha insertado un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen sitios identificados como el sitio o sitios activos o de unión. Otros sitios de interés son aquellos en los que restos particulares obtenidos de diversas cepas o especies son idénticos. Estas posiciones pueden ser importantes para la actividad biológica. Estos sitios, especialmente aquellos que caen en una secuencia de al menos otros tres sitios idénticamente conservados, se pueden sustituir de manera relativamente conservativa. Tales sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 con el encabezamiento de "sustituciones ejemplares".

20

Además, si se desea, se pueden introducir aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición en la esterasa de insecto, o mutantes de la misma. Tales aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido 6-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina,  $\beta$ -alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos de diseño tales como  $\beta$ -metilaminoácidos,  $C\alpha$ -metilaminoácidos,  $N\alpha$ -metilaminoácidos, y análogos de aminoácidos en general.

25

También están incluidas en el alcance de la invención esterasas de insecto, o mutantes de las mismas, que se modifican diferencialmente durante o después de la síntesis, por ejemplo mediante biotilación, bencilación, glucosilación, acetilación, fosforilación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlazamiento a una molécula de anticuerpo o a otro ligando celular, etc. Estas modificaciones pueden servir para incrementar la estabilidad y/o bioactividad del polipéptido de la invención.

35

TABLA 1

Resto original	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg

Resto original	Sustituciones ejemplares
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe, ala

5 Las esterases de insecto, y mutantes de las mismas, se pueden producir de muchas maneras, incluyendo la producción y recuperación de proteínas naturales, la producción y recombinación de proteínas recombinantes, y la síntesis química de las proteínas. En una realización, un polipéptido aislado que codifica la esterasa de insecto, o mutante de la misma, es producido cultivando una célula capaz de expresar el polipéptido en condiciones eficaces para producir el polipéptido, y recuperando el polipéptido. Una célula preferida para el cultivo es una célula recombinante de la presente invención. Las condiciones eficaces de cultivo incluyen, pero no se limitan a, medios eficaces, biorreactor, condiciones de temperatura, pH y oxígeno, que permitan la producción de proteínas. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se cultiva una célula para producir polipéptido de la presente invención. 10 Tal medio comprende típicamente un medio acuoso que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales apropiadas, minerales, metales y otros nutrientes, tales como vitaminas. Las células que producen la esterasa de insecto, o mutantes de la misma, se puede cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación, y cápsulas de petri. El cultivo se puede llevar a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiado para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo están dentro de la pericia del experto normal en la técnica.

Polinucleótidos

Por "polinucleótido aislado" se quiere decir un polinucleótido separado de las secuencias polinucleotídicas con las que está asociado o ligado en su estado nativo. Además, el término "polinucleótido" se usa de forma intercambiable aquí con la expresión "molécula de ácido nucleico".

20 El % de identidad de un polinucleótido se determina mediante análisis de GAP (Needleman y Wunsch, 1970) (programa GCG) con una penalización de creación de salto = 5, y una penalización de extensión de salto = 0,3. La secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 45 nucleótidos, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias a lo largo de una región de al menos 45 nucleótidos. Preferiblemente, la secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 150 nucleótidos, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias a lo largo de una región de al menos 150 nucleótidos. Más preferiblemente, la secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 300 nucleótidos, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias a lo largo de una región de al menos 300 nucleótidos.

Vectores recombinantes

Los vectores recombinantes se pueden usar para expresar una esterasa de insecto, o mutante de la misma, para uso en los métodos de la presente invención.

30 Se describe un vector recombinante, que incluye al menos una molécula polinucleotídica aislada de la presente invención, insertada en cualquier vector capaz de suministrar la molécula polinucleotídica a una célula hospedante. Tales vectores contienen secuencias polinucleotídicas heterólogas, esto es, secuencias polinucleotídicas que no se encuentran naturalmente adyacentes a polinucleótido que codifica la esterasa de insecto, o mutante de la misma, y que derivan preferiblemente de una especie distinta de la especie de la que deriva la esterasa. El vector puede ser 35 ARN o ADN, ya sea procariota o eucariota, y típicamente es un virus o un plásmido.

Un tipo de vector recombinante comprende un polinucleótido que codifica una esterasa de insecto, o mutante de la misma, enlazado operativamente a un vector de expresión. La frase enlazado operativamente se refiere a la inserción de una molécula polinucleotídica en un vector de expresión de manera que la molécula es capaz de ser expresada cuando se transforma en una célula hospedante. Como se usa aquí, un vector de expresión es un vector de ADN o de ARN que es capaz de transformar una célula hospedante o de efectuar la expresión de una molécula polinucleotídica específica. Preferiblemente, el vector de expresión también es capaz de replicarse en la célula hospedante. Los vectores de expresión pueden ser procariotas o eucariotas, y son típicamente virus o plásmidos.

Los vectores de expresión de la presente invención incluyen cualesquiera vectores que funcionan (es decir, dirigen la expresión génica) en células recombinantes de la presente invención, incluyendo células bacterianas, fúngicas, de endoparásitos, de artrópodos, de otro animal, y vegetales. Los vectores de expresión pueden dirigir la expresión génica en células bacterianas, de levaduras, de artrópodos y de mamíferos, y más preferiblemente en los tipos celulares descritos aquí.

Los vectores de expresión pueden contener secuencias reguladoras tales como secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación, y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula recombinante y que controlan la expresión de las moléculas polinucleotídicas. En particular, los vectores de expresión que comprenden un polinucleótido que codifica una esterasa de insecto, o mutante de la misma, incluyen secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, alargamiento y terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Las secuencias de control de la transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda funcionar en al menos una de las células recombinantes. Los expertos en la técnica conocen una variedad de tales secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción preferidas incluyen aquellas que funcionan en células bacterianas, de levaduras, de artrópodos y de mamíferos, tales como, pero sin limitarse a, *tac*, *lac*, *trp*, *trc*, *oxy-pro*, *omp/lpp*, *rrnB*, el bacteriófago lambda, el bacteriófago T7, T7lac, el bacteriófago T3, el bacteriófago SP6, el bacteriófago SP01, metalotioneína, el factor de emparejamiento alfa, alcohol oxidasa de *Pichia*, promotores subgenómicos alfavirus (tales como promotores subgenómicos del virus Sindbis), gen de resistencia a antibióticos, baculovirus, virus del insecto *Heliothis zea*, el virus de la vacuna, el virus del herpes, el poxvirus del mapache, otros poxvirus, adenovirus, citomegalovirus (tales como los promotores tempranos intermedios), el virus 40 del simio, retrovirus, actina, La repetición terminal larga retroviral, el virus del sarcoma Rous, choque térmico, secuencias de control de la transcripción de fosfato y nitrato, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células procariontes o eucariotas. Las secuencias de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejidos.

El polinucleótido que codifica una esterasa de insecto, o mutante de la misma, también (a) puede contener señales secretoras (es decir, secuencias de ácidos nucleicos de segmentos de señal) para permitir que se segregue una esterasa de insecto expresada, o mutante de la misma, a partir de la célula que produce el polipéptido, y/o (b) puede contener secuencias de fusión. Los ejemplos de segmentos de señal adecuados incluyen cualquier segmento de señal capaz de dirigir la secreción de una esterasa de insecto, o mutante de la misma. Los segmentos de señal preferidos incluyen, pero no se limitan a, segmentos señal del activador de plasminógeno tisular (t-PA), de interferón, de interleucina, de la hormona del crecimiento, de histocompatibilidad y de glucoproteína de la cubierta vírica, así como secuencias señal naturales. Además, los polinucleótidos que codifican una esterasa de insecto, o mutante de la misma, se pueden unir a un segmento de fusión que dirige la proteína codificada al proteosoma, tal como el segmento de fusión de ubiquitina.

#### Células hospedantes

Otra realización aquí descrita incluye una célula recombinante que comprende una célula hospedante transformada con uno o más polinucleótidos que codifican una esterasa de insecto, o mutante de la misma. La transformación de una molécula polinucleotídica en una célula se puede lograr mediante cualquier método mediante el cual se puede insertar una molécula polinucleotídica en la célula. Las técnicas de transformación incluyen, pero no se limitan a, transfección, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, y fusión de protoplastos. Una célula recombinante puede seguir siendo unicelular, o puede crecer hasta un tejido, órgano o un organismo multicelular. Un polinucleótido transformado que codifica una esterasa de insecto, o mutante de la misma, puede seguir siendo extracromosómico, o se puede integrar en uno o más sitios en un cromosoma de la célula transformada (es decir, recombinante), de tal manera que se retenga su capacidad para ser expresado.

Las células hospedantes adecuadas a transformar incluyen cualquier célula que se puede transformar con un polinucleótido que codifica una esterasa de insecto, o mutante de la misma. Las células hospedantes pueden ser capaces endógenamente (es decir, de forma natural) de producir una esterasa de insecto o mutante de la misma, o pueden ser capaces de producir tales proteínas después de ser transformadas con al menos un polinucleótido que codifica una esterasa de insecto, o mutante de la misma. Las células hospedantes pueden ser cualquier célula capaz de producir al menos una esterasa de insecto, o mutante de la misma, e incluyen células bacterianas, fúngicas (incluyendo de levadura), de parásitos, de artrópodos, de animales y de plantas. Las células hospedantes preferidas incluyen células bacterianas, micobacterianas, de levadura, de artrópodos y de mamíferos. Las células hospedantes más preferidas incluyen *Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Listeria*, *Saccharomyces*, *Spodoptera*, *Mycobacteria*, *Trichoplusia*, células BHK (riñón de hámster bebé), células MDCK (estirpe celular de riñón de perro normal, para el cultivo del virus del herpes canino), células CRFK (estirpe celular de riñón de gato normal, para el cultivo del virus del herpes felino), células CV-1 (estirpe celular de riñón de mono africano, usada, por ejemplo, para cultivar poxvirus de mapache), células COS (por ejemplo, COS-7), y células Vero. Las células hospedantes particularmente preferidas son *E. coli*, incluyendo derivados K-12 de *E. coli*; *Salmonella typhi*; *Salmonella typhimurium*, incluyendo cepas atenuadas; *Spodoptera frugiperda*; *Trichoplusia ni*; células BHK; células MDCK; células CRFK; células CV-1; células COS; células Vero; y células de mioblasto de ratón no tumorigénico G8 (por



ejemplo, ATCC CRL 1246). Los hospedantes de células de mamíferos apropiados adicionales incluyen otras estirpes celulares de riñón, otras estirpes celulares de fibroblastos (por ejemplo, estirpes celulares de fibroblastos de embrión humano, murino o de pollo), estirpes celulares de mieloma, células de ovario de hámster chino, células NIH/3T3 de ratón, células LMTK y/o células HeLa.

5 Las tecnologías de ADN recombinante se pueden usar para mejorar la expresión de una molécula polinucleotídica transformada manipulando, por ejemplo, el número de copias de la molécula polinucleotídica en una célula hospedante, la eficiencia con la que se transcriben esas moléculas polinucleotídicas, la eficiencia con la que se traducen los transcritos resultantes, y la eficiencia de las modificaciones post-traduccionales. Las técnicas recombinantes útiles para incrementar la expresión de un polinucleótido que codifica una esterasa de insecto, o  
10 mutante de la misma, incluyen, pero no se limitan a, moléculas polinucleotídicas que se enlazan operativamente a plásmidos de número elevado de copias, integración de la molécula polinucleotídica en uno o más cromosomas de la célula hospedante, adición de secuencias de estabilidad del vector a plásmidos, sustituciones o modificaciones de señales de control de la transcripción (por ejemplo, promotores, operadores, potenciadores), sustituciones o modificaciones de señales de control de la traducción (por ejemplo, sitios de unión al ribosoma, secuencias de Shine-Dalgarno), modificación de las moléculas polinucleotídicas de la presente invención para que correspondan al  
15 uso de codones de la célula hospedante, y la supresión de secuencias que desestabilizan los transcritos.

#### Composiciones

Las composiciones que pueden ser útiles para los métodos de la presente invención, o que comprenden un polipéptido para uso en los métodos de la presente invención, incluyen excipientes, también denominados aquí  
20 como "vehículos aceptables". Un excipiente puede ser cualquier material que puede tolerar el animal, planta, material vegetal o animal, o medioambiente (incluyendo muestras de suelo y de agua) a tratar. Los ejemplos de tales excipientes incluyen agua, disolución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, disolución de Hank, y otras disoluciones salinas acuosas fisiológicamente equilibradas. También se pueden usar vehículos no acuosos, tales como aceites fijos, aceite de sésamo, oleato de etilo, o triglicéridos. Otras formulaciones útiles incluyen  
25 suspensiones que contienen agentes que mejoran la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Los excipientes también pueden contener cantidades pequeñas de aditivos, tales como sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química. Los ejemplos de tampones incluyen tampón de fosfato, tampón de bicarbonato y tampón Tris, mientras que los ejemplos de conservantes incluyen timerosal u o-cresol, formalina y alcohol bencilico. Los excipientes también se pueden usar para incrementar el período de caducidad de una  
30 composición, por ejemplo, pero sin limitarse a, vehículos poliméricos de liberación controlada, implantes biodegradables, liposomas, bacterias, virus, otras células, aceites, ésteres, y glicoles.

Además, la esterasa de insecto, o mutante de la misma, se puede proporcionar en una composición que mejora la velocidad y/o grado de degradación de los plaguicidas o toxinas de ésteres hidrófobos, o incrementa la estabilidad del polipéptido. Por ejemplo, la esterasa de insecto, o mutante de la misma, se puede inmovilizar en una matriz de poliuretano (Gordon et al., 1999), o se puede encapsular en liposomas apropiados (Petrikovics et al. 2000a y b). La esterasa de insecto, o mutante de la misma, también se puede incorporar en una composición que comprende una  
35 espuma, tal como las usadas habitualmente en la lucha contra el fuego (LeJeune et al., 1998).

Como apreciarán los destinatarios expertos, la esterasa de insecto, o mutante de la misma, se podría usar fácilmente en una esponja o espuma, como se describe en el documento WO 00/64539.

40 Se describe una formulación de liberación controlada que es capaz de liberar lentamente una composición que comprende una esterasa de insecto, o mutante de la misma, en un animal, planta, material animal o vegetal, o el medioambiente (incluyendo muestras de suelo y de agua). Como se describe aquí, una formulación de liberación controlada comprende una esterasa de insecto, o mutante de la misma, en un vehículo de liberación controlada. Los vehículos adecuados de liberación controlada incluyen, pero no se limitan a, polímeros biocompatibles, otras  
45 matrices poliméricas, cápsulas, microcápsulas, micropartículas, preparaciones de bolo, bombas osmóticas, dispositivos de difusión, liposomas, lipoesferas, y sistemas de suministro transdérmico. Las formulaciones preferidas de liberación controlada son biodegradables (es decir, bioerosionables).

Una formulación preferida de liberación controlada es capaz de liberar una esterasa de insecto, o mutante de la misma, en el suelo o en el agua, que es un área pulverizada con un plaguicida o toxina de éster hidrófobo. La formulación es liberada preferiblemente durante un período de tiempo que oscila desde alrededor de 1 hasta  
50 alrededor de 12 meses. Una formulación preferida de liberación controlada es capaz de efectuar un tratamiento, preferiblemente durante al menos alrededor de 1 mes, más preferiblemente durante al menos alrededor de 3 meses, incluso más preferiblemente durante al menos alrededor de 6 meses, incluso más preferiblemente durante al menos alrededor de 9 meses, e incluso más preferiblemente durante al menos alrededor de 12 meses.

55 La concentración de la esterasa de insecto, o mutante de la misma (o célula hospedante que expresa la esterasa de insecto, o mutante de la misma), que se requerirá para producir composiciones eficaces para degradar un plaguicida o toxina de éster hidrófobo dependerá de la naturaleza de la muestra a descontaminar, de la concentración del plaguicida o toxina de éster hidrófobo en la muestra, y de la formulación de la composición. La concentración eficaz de la esterasa de insecto, o mutante de la misma (o célula hospedante que expresa la esterasa de insecto, o

mutante de la misma), en una composición, se puede determinar fácilmente de forma experimental, como entenderá el experto.

#### Tensioactivos

5 Se prevé que el uso de un tensioactivo en el método de la presente invención puede liberar plaguicidas y/o toxinas de ésteres hidrófobos a partir, por ejemplo, de cualquier sedimento en la muestra. De este modo se incrementa la eficiencia del método de la presente invención.

10 Los tensioactivos son moléculas anfipáticas con restos tanto hidrófilos como hidrófobos (generalmente hidrocarbonados) que se reparten preferentemente en la interfaz entre las fases fluidas y grados diferentes de polaridad y de enlace de hidrógeno, tales como las interfaces aceite/agua o aire/agua. Estas propiedades hacen a los tensioactivos capaces de reducir la tensión superficial e interfacial y formar una microemulsión en la que los hidrocarburos se pueden solubilizar en agua, o en la que el agua se puede solubilizar en los hidrocarburos. Los tensioactivos tienen un número de propiedades útiles, incluyendo rasgos dispersantes.

15 Los biotensioactivos son un grupo estructuralmente diverso de moléculas tensioactivas sinterizadas por microorganismos. Estas moléculas reducen las tensiones superficial e interfacial tanto en disoluciones acuosas como en mezclas de hidrocarburos. Los biotensioactivos tienen varias ventajas con respecto a los tensioactivos químicos, tales como una menor toxicidad, una mayor biodegradabilidad, una mejor compatibilidad medioambiental, una mayor espumación, selectividad y especificidad elevadas a temperaturas extremas, pH y salinidad, y la capacidad para ser sintetizados a partir de una fuente renovable.

20 Los biotensioactivos útiles en los métodos de biorremediación de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: glucolípidos tales como ramnolípidos (por ejemplo, de *Pseudomonas aeruginosa*), tehalolípidos (por ejemplo, de *Rhodococcus erythropolis*), soforolípidos (por ejemplo, de *Torulopsis bombicola*), y celobiolípidos (por ejemplo, de *Ustilago zaeae*); lipopéptidos y lipoproteínas tales como serrawetina (por ejemplo, de *Serratia marcescens*), surfactina (por ejemplo, de *Bacillus subtilis*); subtilisina (por ejemplo, de *Bacillus subtilis*), gramicidinas (por ejemplo, de *Bacillus brevis*), y polimixinas (por ejemplo, de *Bacillus polymyxa*); ácidos grasos, lípidos neutros, y fosfolípidos; tensioactivos poliméricos tales como emulsán (por ejemplo, de *Acinetobacter calcoaceticus*), biodispersán (por ejemplo, de *Acinetobacter calcoaceticus*), lipoproteína de manano (por ejemplo, de *Candida tropicalis*), liposán (por ejemplo, de *Candida lipolytica*), proteína PA (por ejemplo, de *Pseudomonas aeruginosa*); y biotensioactivos en partículas tales como vesículas y cimbrias, por ejemplo de *A. calcoaceticus*.

#### Plantas transgénicas

30 El término "planta" se refiere a plantas completas, órganos vegetales (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales, y similares. Las plantas contempladas para uso en la práctica de la presente invención incluye tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Las monocotiledóneas ejemplares incluyen trigo, cebada, centeno, triticale, avenas, arroz, y similares.

35 Las plantas transgénicas, como se definen en el contexto de la presente invención, incluyen plantas (así como partes y células de dichas plantas) y su progenie que se han modificado genéticamente usando técnicas de ADN recombinante para i) provocar la producción de la esterasa de insecto, o mutante de la misma, en la planta deseada u órgano vegetal.

40 Existen varias técnicas para introducir material genético extraño en una célula vegetal. Tales técnicas incluyen la aceleración de material genético revestido en micropartículas directamente en las células (véanse, por ejemplo, los documentos US 4.945.050 y US 5.141.131). Las plantas se pueden transformar usando tecnología de *Agrobacterium* (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.177.010, US 5.104.310, US 5.004.863, US 5.159.135). La tecnología de electroporación también se ha usado para transformar plantas (véanse, por ejemplo, los documentos WO 87/06614, US 5.472.869, 5.384.253, WO 92/09696 y WO 93/21335). Además de numerosas tecnologías para transformar plantas, igualmente puede variar el tipo de tejido que se pone en contacto con los genes extraños. Tal tejido incluiría, pero no se limitaría a, tejido embriogénico, tejido calloso tipo I y tipo II, hipocotilo, meristemo, y similar. Casi todos los tejidos vegetales se pueden transformar durante el desarrollo y/o diferenciación usando técnicas apropiadas descritas aquí.

50 Por ejemplo, en Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, sup. 1987; Weissbach y Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; y Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990, se ha descrito un número de vectores adecuados para la transcripción estable de células vegetales, o para el establecimiento de plantas transgénicas. Típicamente, los vectores de expresión vegetales incluyen, por ejemplo, uno o más genes vegetales clonados bajo el control transcripcional de secuencias reguladoras de 5' y 3' y un marcador seleccionable dominante. Tales vectores de expresión vegetal también pueden contener una región reguladora promotora (por ejemplo, una región reguladora que controla la expresión inducible o constitutiva, regulada de manera medioambiental o por el desarrollo, o específica de células o tejidos), un sitio de comienzo de iniciación de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, una señal de procesamiento del ARN, un sitio de terminación de la transcripción, y/o una señal de poliadenilación.

Los ejemplos de promotores vegetales incluyen, pero no se limitan a, la subunidad pequeña de ribulosa-1,6-bisfosfato carboxilasa, el promotor de beta-conglicinina, el promotor de faseolina, el promotor de ADH, los promotores de choque térmico y los promotores específicos de tejidos. Los promotores también pueden contener ciertos elementos de secuencias potenciadoras, que pueden mejorar la eficiencia de la transcripción. Los potenciadores típicos incluyen, pero no se limitan a, el intrón 1 de Adh y el intrón 6 de Adh.

Los promotores constitutivos dirigen la expresión génica continua en todos los tipos celulares y en todo momento (por ejemplo, actina, ubiquitina, CaMV 35S). Los promotores específicos de tejidos son responsables de la expresión génica en tipos celulares o tisulares específicos, tales como las hojas o semillas (por ejemplo, zeína, oleoxina, napina, ACP, globulina, y similares), y estos promotores también pueden ser usados. Los promotores también pueden ser activos durante una cierta etapa del desarrollo de las plantas, así como también activos en tejidos y órganos vegetales. Los ejemplos de tales promotores incluyen, pero no se limitan a, promotores específicos del polen, específicos del embrión, específicos de la seda del maíz, específicos de la fibra de algodón, específicos de raíces, específicos del endospermo de semillas, y similares.

En ciertas circunstancias puede ser deseable usar un promotor inducible. Un promotor inducible es responsable de la expresión de genes en respuesta a una señal específica, tal como: estímulo físico (genes del choque térmico); luz (RUBP carboxilasa); hormona (Em); metabolitos; y estrés. Se pueden usar otros elementos de la transcripción y de la traducción deseables que funcionan en plantas.

Además de los promotores vegetales, para expresar genes extraños se pueden usar eficientemente en células vegetales promotores procedentes de una variedad de fuentes. Por ejemplo, se pueden usar promotores de origen bacteriano, tales como el promotor de octopina sintasa, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de manopina sintasa; promotores de origen vegetal, tales como el virus del mosaico de la coliflor (35S y 19S); y similares.

Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos, y no pretenden limitar o definir de ninguna manera la invención.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Construcción de mutantes

En la Figura 1 se da un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la enzima E3 con la de una acetilcolinesterasa de vertebrado (TcAChE, para la cual se conoce la estructura tridimensional; Sussman et al., 1991). Se construyeron mutantes de E3 y EST23 usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange™ de Stratagene, y se nombran según el número de resto que se ha cambiado, y la naturaleza de ese cambio. Por ejemplo, el mutante E3W251L es un mutante de E3 en el que el resto de Trp en la posición 251 en la enzima de tipo salvaje (es decir, E3WT) se ha mutado a Leu.

Las enzimas E3 y EST23 se expresaron usando el sistema de expresión de baculovirus como se describe por Newcomb et al. (1997), pero usando el medio libre de suero HyQ SFX-insect (HyClone) para la expresión incrementada. Los extractos celulares se prepararon lisando las células a una concentración de  $10^8$  células  $\text{ml}^{-1}$  en tampón de fosfato 0,1M, pH 7,0, que contiene 0,05% de Triton X-100. Los extractos se titularon entonces para determinar el número de moléculas de esterasa usando un ensayo fluorométrico basado en la liberación inicial de cumarina (un compuesto fluorescente) con la fosforilación de la enzima mediante fosfato de dietilcumarilo (dECP).

La Figura 2 ilustra la configuración propuesta del sitio activo de E3 (basada en la estructura tridimensional de AChE de vertebrado) en una reacción de acilación. Se examinaron mutaciones en siete restos de E3 en regiones que corresponden a tres subsitios distintos del sitio activo de AChE conocido. Estos son el agujero de oxoanión (resto 137 de E3), el sitio aniónico (restos 148, 217 y 354 de E3) y el bolsillo de unión a acilo (restos 250, 251 y 309 de E3). El sitio aniónico y el bolsillo de unión a acilo corresponden a los subsitios p1 y p2 en la nomenclatura de Jarv (1984).

#### Mutaciones en el agujero de oxoanión

En TcAChE, el agujero de oxoanión comprende Gly118, Gly119 y Ala201, que corresponden a Gly136, Gly137 y Ala219 en E3. Estos restos están muy conservados a lo largo de la familia multigénica de carboxilcolinesterasas (Oakeshott et al., 1999), y hay pruebas empíricas para la conservación de la estructura de agujero de oxoanión a partir de estudios cristalográficos mediante rayos X de varias colinesterasas y lipasas (Cygler y Schrag, 1997), aunque la estructura cambia durante la activación interfacial en algunas lipasas (Derewenda et al., 1992). También hay pruebas estructurales empíricas de su función estabilizando el oxoanión formado por el oxígeno carbonílico del sustrato de éster carboxílico como el primer estado de transición durante la catálisis (Grochulski et al., 1993; Martínez et al., 1994). Esta estabilización se logra mediante una red de enlaces de hidrógeno a los grupos amida de los tres restos clave en la cadena peptídica (Ordentlich et al., 1998). Recientemente, Koellner et al. (2000) también han mostrado que ambos restos de Gly en el agujero de oxoanión de AChE crean enlaces de hidrógeno con moléculas de agua "estructurales" enterradas, que son retenidas durante la catálisis y se piensa que actúan como lubricantes para facilitar el tráfico de sustratos y productos en el sitio activo.

Se realizaron tres mutaciones adicionales al Gly137 de E3, además de la G137D encontrada naturalmente en *L. cuprina* resistente a OP. En primer lugar, Glu se sustituyó como el otro aminoácido ácido, en G137E. También se construyó el mutante G137H, debido a que His tampoco está protonado a pH neutro ( $pK_a$  de alrededor de 6,5, véase 4,4 para Asp y Glu), y se encontró que confiere cierta hidrólisis de OP sobre butirilcolinesterasa humana cuando se sustituye por Gly en su agujero de oxoanión (Broomfield et al., 1999). Finalmente, Arg ( $pK_a$  de alrededor de 12) se sustituyó en la posición 137, para examinar los efectos de la sustitución fuertemente básica más posible.

#### Mutaciones en el bolsillo de unión a acilo

Los bolsillos de unión a acilo de colinesterasas caracterizadas estructuralmente se forman principalmente a partir de cuatro restos no polares, tres de los cuales son generalmente también aromáticos. Juntos crean un bolsillo fuertemente hidrófobo para acomodar el resto acilo de sustrato unido. Los cuatro restos en TcAChE son Trp233, Phe288, Phe290 y Val400, que corresponden a Trp251, Val307, Phe309 y Phe422 en E3. Conjuntos similares de restos hidrófobos parecen conservarse en los sitios correspondientes de la mayoría de las carboxilcolinesterasas (Oakeshott et al., 1993; Robin et al., 1996; Yao et al., 1997; Harel et al., 2000). En particular, Trp está fuertemente conservado en el resto 233/251, y 290/309 es Phe en colinesterasas y la mayoría de carboxilesterasas, aunque una Leu o Ile en varias lipasas y unas pocas carboxilesterasas. El resto que corresponde a TcAChE Phe288 es típicamente un aminoácido alifático de cadena ramificada en colinesterasas, que muestra preferencia por ésteres de cadenas más largas tales como butirilcolina. Esto incluye butirilcolinesterasa de mamífero y algunas acetilcolinesterasas de insecto, que tienen una especificidad por sustrato similar a butirilcolinesterasa. El aminoácido alifático de cadena ramificada parece proporcionar un mayor espacio en el bolsillo de unión a acilo, para alojar el grupo acilo más grande.

Los estudios mutacionales de 288/307 y 290/309 en varias colinesterasas confirman su papel clave a la hora de determinar aspectos de especificidades por el sustrato relacionados con la identidad del grupo acilo. En AChE humana, la sustitución del Phe en cualquier posición por un resto más pequeño como Ala mejora la cinética de la enzima por sustratos como propil- o butil-(tío)colina con grupos acilo más grandes que el sustrato natural de acetil(tío)colina (Ordentlich et al., 1993). En AChE de *D. melanogaster* y la mosca doméstica, *Musca domestica*, las mutaciones naturales de su 290/309 equivalente al Tyr polar más voluminoso que contribuye a la resistencia a OP del sitio diana tienen menor reactividad tanto frente a acetilcolina como a OPs (Fournier et al., 1992; Walsh et al., 2001). Para AChE de *D. melanogaster*, la sustitución de este resto de Phe por el Leu más pequeño dio el incremento predicho en la sensibilidad a OP, aunque sorprendentemente la sustitución por otros restos pequeños como Gly, Ser o Val no lo hizo (Villatte et al., 2000).

Trp 233/251 ha recibido mucha menos atención en estudios mutacionales de colinesterasas, pero un trabajo previo sobre E3 muestra que su sustitución por un resto de Leu más pequeño incrementa nuevamente la reactividad para sustratos de éster carboxílico con restos acílicos voluminosos como en malatión, o para OPs (Campbell et al., 1998a, b; Devonshire et al., 2002). También se ha encontrado una mutación a Gly en un homólogo de la avispa, *Anisopteromalus calandreae*, que muestra una cinética mejorada de malatión carboxilesterasa (MCE) (Zhu et al., 1999), aunque se ha encontrado un Ser en un homólogo de *M. domestica* que se puede asociar con resistencia a malatión (Claudianos et al., 2002). Con respecto a la actividad de OP hidrolasa, Devonshire et al. (2002) proponen que el beneficio particular de tales mutaciones es alojar la inversión alrededor del fósforo que se debe de producir para que transcurra la segunda etapa de hidrólisis de la reacción. De forma notable, Devonshire et al. (2002) encontraron que la  $k_{cat}$  para la actividad de OP hidrolasa de E3W251L es un orden de magnitud mayor para dMUP, con su grupo de dimetilfosfato más pequeño que para dECP, que tiene un grupo de dietilfosfato. Esto sugiere que sigue habiendo fuertes restricciones estéricas en la inversión, incluso en un mutante con un bolsillo de acilo más grande.

Se han mutado tanto los restos W251 como F309 de E3, así como el P250 inmediatamente adyacente a W251. Además de la mutación natural W251L previamente caracterizada, ahora se han analizado sustituciones con otros cuatro aminoácidos pequeños en W251S, W251G, W251T y W251A. También se analizó un doble mutante de W251L y P250S, debido a que una variante natural del ortólogo de E3 en *M. domestica* con elevada actividad de MCE tiene Ser y Leu en las posiciones 250 y 251, respectivamente. Sólo se examinó una sustitución de F309, F309L, cuyos resultados de AChE sugieren que debería mejorar las actividades de MEC y de OP hidrolasa. F309L se analizó sola y como un doble mutante con W251L.

#### Mutaciones en el sitio aniónico

El sitio aniónico de colinesterasas se denomina algunas veces el sitio de unión cuaternario (por el amonio cuaternario en acetilcolina), o el subsitio p1 en la nomenclatura original de Jarv (1984). principalmente implica Trp 84, Glu 199 y Phe 330, estando implicados también Phe 331 y Tyr 130 (nomenclatura de TcAChE). Excepto para Glu 199, es de este modo un sitio muy hidrófobo. Glu 199 está inmediatamente adyacente al Ser 200 catalítico. Los restos clave están muy conservados a lo largo de colinesterasas, y en menor medida a lo largo de muchas carboxilesterasas (Oakeshott et al., 1993; Ordentlich et al., 1995; Robin et al., 1996; Claudianos et al., 2002). Excepto para Trp 84 (el alineamiento de secuencias en la Figura 1 muestra que E3 no tiene restos que corresponden a los restos 74-85 de AChE), E3 tiene restos idénticos a TcAChE en las posiciones correspondientes (217, 354 y 148, respectivamente). De forma interesante, el equivalente de Glu 199 es Gln, y el equivalente del Phe

330 es Leu en algunas lipasas y en ciertas carboxilesterasas, cuyos sustratos se sabe que tienen pequeños grupos salientes (Thomas et al., 1999; Campbell et al., 2001; Claudianos et al., 2002).

Estudios estructurales y mutacionales han proporcionado una fotografía detallada del papel del sitio aniónico en la catálisis de colinesterasas. Los restos clave forman parte de una red enlazada mediante hidrógeno en la parte inferior del sitio activo, compartiendo también Tyr 130 y Glu 199 contacto con una molécula de agua estructural (Ordentlich et al., 1995; Koellner et al., 2000). El sitio aniónico sufre un cambio conformacional cuando el sustrato se une a un sitio de unión periférico en el borde de la garganta del sitio activo, alojando la nueva conformación al grupo (saliente) colina del sustrato y facilitando la interacción de su carbono carbonílico con el Ser 200 catalítico (Shafferman et al., 1992; Ordentlich et al., 1995; 1996). Consiguientemente, el sitio funciona principalmente en la primera etapa de la reacción, la acilación de la enzima, y, en particular, en la formación del estado de transición no covalente (Nair et al., 1994). Por lo tanto, las mutaciones de los restos clave afectan principalmente a  $K_m$  en lugar de a  $k_{cat}$ . Las interacciones con el grupo saliente colina están mediadas principalmente a través de interacciones no polares y de electrones  $\pi$ , que implican principalmente a Trp 84 y Phe 330 (Ordentlich et al., 1995).

Los estudios con inhibidores de OP sugieren que el sitio aniónico de colinesterasas también aloja su grupo saliente, pero hay algunas pruebas de que parte del sitio (principalmente Glu 199 y Tyr 130; también posiblemente Ser 226) también puede afectar entonces a la reactividad de la enzima fosforilada (Qian y Kovach, 1993; y véanse también Ordentlich et al., 1996; Thomas et al., 1999).

Se ha realizado poco análisis mutacional de sitios de carboxilesterasas que corresponden al sitio aniónico de AChE, pero una excepción interesante implica la EST6 carboxilesterasa de *D. melanogaster*, que tiene un His en el equivalente de Glu 199. Un mutante en el que este His es sustituido por Glu muestra actividad reducida frente a diversos sustratos de éster carboxílico, pero ha adquirido cierta actividad hidrolítica de acetilcolina (Myers et al., 1993). La E4 carboxilesterasa del áfido *Myzus persicae* tiene un Met en esta posición, y esta enzima es inhabitualmente reactiva a OPs (Devonshire y Moores, 1982). Sin embargo, no se sabe si el Met contribuye a la actividad de OP hidrolasa. De forma similar, una sustitución Y148F es una de las varias registradas en el ortólogo de E3 en una cepa resistente a OP (es decir, también G137D) de *M. domestica*, pero no se sabe si este cambio contribuye directamente a la actividad de OP hidrolasa (Claudianos et al., 1999).

Ahora se han mutado los restos Y148, E217 y F354 en E3. Se realizaron las mutaciones E217M e Y148F para ensayar si las mutaciones correspondientes en las enzimas de *M. persicae* y *M. domestica* anteriores contribuyen directamente a la reactividad de OP. También se ensayó Y148F en un mutante doble G137D, puesto que esta es la combinación encontrada en la *M. domestica* resistente. F354 se mutó tanto para un resto de Leu más pequeño y un Trp más grande, encontrándose habitualmente Leu en esta posición en lipasas (véase anteriormente).

## Ejemplo 2: Titulaciones de enzimas

Se llevaron a cabo cuatro reacciones de 100  $\mu$ l para cada esterasa expresada, en columnas 1-4 de microplacas:

blanco de pocillo de placa, que contiene 0,025% de Triton X-100, tampón de fosfato 0,1M, pH 7,0;

blanco de sustrato, que contiene 100  $\mu$ M de dECP en 0,025% de Triton X-100, tampón de fosfato 0,1M, pH 7,0;

blanco de célula, que contiene 50  $\mu$ l de extracto celular mezclado 1:1 con tampón de fosfato 0,1M, pH 7,0;

reacción de titulación, que contiene 50  $\mu$ l de extracto celular mezclado 1:1 con tampón de fosfato 0,1M, pH 7,0, que contiene 200  $\mu$ M de dECP.

Todos los componentes excepto dECP (recientemente preparado a una concentración de 200  $\mu$ M en tampón) se colocaron en los pocillos. Se ensayaron simultáneamente varias enzimas en una placa, y las reacciones se comenzaron añadiendo simultáneamente dECP a los pocillos 2<sup>o</sup> y 4<sup>o</sup> hacia abajo de una columna. El intervalo hasta la primera lectura (típicamente 1 minuto) se anotó para los cálculos subsiguientes.

El valor medio para el blanco del pocillo de la placa (A) se restó de todas las lecturas antes de otros cálculos. Experimentos preliminares con diversos extractos celulares mostraron que dieron cierta fluorescencia a 460 nm, y que su adición a disoluciones del producto de ensayo, 7-hidroxycumarina, extinguió la fluorescencia en 39 ( $\pm$ 7)%. Por lo tanto, los valores de la fluorescencia en las reacciones de titulación (D) se corrigieron para este efecto de extinción después de restar la fluorescencia intrínseca de los extractos celulares (C). Finalmente, el blanco del sustrato (B), tomado como la media de todos los ensayos simultáneos en una placa, se restó para dar la fluorescencia corregida provocada por la cumarina liberada por la esterasa. Estas correcciones fueron muy importantes para estirpes celulares que expresan esterasa a un nivel muy bajo (<1 pmol/ $\mu$ l de extracto).

Los datos completamente corregidos se representaron gráficamente como una curva de progreso, y la pendiente del equilibrio se extrapoló hasta tiempo cero para determinar la cantidad de esterasa, basada en su interacción estequiométrica con el inhibidor (la concentración de 100  $\mu$ M de dECP dio una saturación completa de los sitios catalíticos de esterasa de todas estas enzimas en 10-20 minutos). Se preparó una curva de calibración para 7-

hidroxicumarina junto con las reacciones en todas las placas, y se usó para calcular la concentración molar de la enzima y de la formación de producto.

La Figura 3 muestra los resultados de experimentos de titulación representativos llevados a cabo en extractos celulares que contienen esterasas expresadas en baculovirus.

### 5 Ejemplo 3: Ensayos de hidrólisis de permetrina

Las enzimas expresadas se ensayaron para determinar la actividad hidrolítica de permetrina usando un ensayo de reparto radiométrico para compuestos marcados en el ácido, o un ensayo a base de TLC para aquellos marcados en el resto alcohólico (Devonshire y Moores, 1982). Las características de los ensayos incluyen mantener la concentración de permetrina por debajo de su solubilidad publicada en disolución acuosa ( $0,5 \mu\text{M}$ ), la concentración de detergente (usado para extraer la enzima de las células de insecto en las que se expresa) por debajo de la concentración micelar crítica ( $0,02\%$  para Triton X100), y llevar a cabo los ensayos rápidamente (es decir, en 10-30 minutos) para minimizar la pegajosidad del sustrato a las paredes de los tubos de ensayo (se usaron tubos de vidrio para minimizar la pegajosidad). A estas concentraciones de permetrina, la enzima no es saturada por el sustrato, de manera que no se pudieron determinar los valores de  $K_m$ . Sin embargo, las constantes de especificidad ( $k_{cat}/K_m$ ) se pudieron calcular de forma exacta para cada una de las enzimas con actividad de permetrina, lo que permite la comparación directa de su eficiencia a bajas concentraciones de sustrato. El poder de los análisis se incrementó separando permetrina en sus isómeros *cis* y *trans*.

#### (a) Separación de isómeros *cis* y *trans* de permetrina

Las preparaciones comerciales de permetrina contienen cuatro estereoisómeros: 1S *cis*, 1R *cis*, 1S *trans*, 1R *trans* (Figura 4). Se usó cromatografía de capa fina (TLC) preparativa sobre sílice para separar los isómeros en dos pares de enantiómeros: 1S/1R *cis* y 1S/1R *trans*. Los enantiómeros no se pudieron separar más. Las preparaciones enzimáticas se pudieron ensayar entonces para determinar la hidrólisis de cada par de enantiómeros.

#### (b) Protocolo de ensayo

##### Piretroides radiomarcados en el resto ácido

Este ensayo (Devonshire y Moores, 1982) se usa para isómeros de permetrina. Se basa en incubar la esterasa expresada con el sustrato radiomarcado, y después medir el anión ciclopropanocarboxilato radioactivo en la fase acuosa después de extraer el sustrato sin cambiar en un disolvente orgánico. Basándose en la experiencia previa, el mejor protocolo de extracción utiliza una mezcla 2:1 (en volumen) de metanol y cloroformo. Cuando se mezcla en la proporción apropiada con alícuotas de la incubación de ensayo, la mezcla consiguiente de tampón, metanol y cloroformo es monofásica, que sirve para detener la reacción enzimática y asegurar la completa solubilización del piretroide. La adición subsiguiente de un exceso de cloroformo y tampón supera la capacidad del metanol para mantener juntas las fases, de manera que la fase orgánica se puede eliminar y el producto se puede medir en la fase acuosa. Con detalle, el protocolo es como sigue.

Se añadió tampón de fosfato ( $0,1\text{M}$ , pH 7,0) a permetrina radiomarcada ( $50 \mu\text{M}$  en acetona) para dar una disolución  $1 \mu\text{M}$ , y el ensayo se comenzó entonces añadiendo un volumen igual de esterasa expresada diluida apropiadamente en el mismo tampón. El trabajo preliminar había establecido que la concentración de detergente (Triton X-100 usado para extraer esterasa de las células cosechadas) en la incubación tenía que estar por debajo de su CMC (concentración micelar crítica de  $0,02\%$ ), para evitar que el piretroide muy lipófilo se repartiese en las micelas y no estuviese disponible para la enzima. Típicamente, el volumen final del ensayo fue  $500\text{-}1000 \mu\text{l}$ , con concentraciones de sustrato y de acetona de  $0,5 \mu\text{M}$  y  $1\%$ , respectivamente. A intervalos que oscilan desde 30 segundos hasta 10 minutos a una temperatura de  $30^\circ$ , se retiraron alícuotas de  $100 \mu\text{l}$  de la incubación, se añadieron a tubos que contienen  $300 \mu\text{l}$  de la mezcla 2:1 de metanol-cloroformo, y se mezclaron con remolino. Los tubos se mantuvieron entonces a la temperatura ambiente hasta que se pudo procesar adicionalmente un lote junto, bien al final de la incubación o bien durante un intervalo de muestreo prolongado. Después de añadir  $50 \mu\text{l}$  de tampón y  $100 \mu\text{l}$  de cloroformo, la mezcla se mezcló con remolino, se centrifugó, y la fase orgánica inferior se eliminó con una jeringuilla Hamilton de  $500 \mu\text{l}$  y se desechó. La extracción se repitió después de añadir otros  $100 \mu\text{l}$  de cloroformo, y después se eliminaron  $200 \mu\text{l}$  de la fase acuosa superior (usando un aparato para pipetear con una punta fina) para el recuento por centelleo. Es crucial evitar recoger cualquier fase orgánica. Puesto que el volumen final de la fase acuosa fue  $260 \mu\text{l}$  (incluyendo algo de metanol), los recuentos totales producidos en la alícuota inicial de  $100 \mu\text{l}$  se corrigieron en consecuencia.

##### Piretroides radiomarcados en el resto alcohólico

#### i) Piretroides tipo I – análogos dibromados (NRDC157) de permetrina:

El alcohol 3-fenoxibencílico formado en la hidrólisis de estos ésteres no se reparte en la fase acuosa en el procedimiento de extracción con cloroformo-metanol. Por lo tanto, fue necesario separar este producto del sustrato mediante TLC sobre sílice (Devonshire y Mooers, 1982). Con detalle, el protocolo es como sigue.

Las incubaciones se realizaron de la misma manera que para los sustratos marcados en el resto ácido. Las reacciones se detuvieron a intervalos en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  tomadas de la incubación mezclando inmediatamente con 200  $\mu\text{l}$  de acetona a  $-79^\circ$  ( $\text{CO}_2$  sólido). Después, se transfirieron 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla, junto con 3  $\mu\text{l}$  de alcohol 3-fenoxibencílico no radioactivo (2% en acetona), sobre la zona de carga de placas F254 de sílice acanaladas LinearQ (Whatman). Después de desarrollar en una mezcla 10:3 de tolueno (saturado con ácido fórmico) con éter dietílico, el sustrato y el producto se localizaron mediante radioautografía durante 6-7 días (confirmando una movilidad idéntica del producto a la del alcohol 3-fenoxibencílico estándar frío revelado bajo luz UV). Estas áreas de la placa de TLC se impregnaron entonces con Neatan (Merck) y se secaron, después de lo cual se pelaron del soporte de vidrio y se transfirieron a viales para el recuento por centelleo. Los recuentos se corrigieron para la dilución de 3 veces de los 100  $\mu\text{l}$  iniciales mediante acetona antes del manchado en la sílice.

ii) Piretroides tipo II – isómeros de deltametrina:

Los experimentos preliminares, en los que las incubaciones se analizaron mediante TLC como antes, mostraron principalmente la formación de ácido 3-fenoxibenzoico, en línea con los informes de la bibliografía de que el producto de la hidrólisis de cianohidrina inicial se convierte rápidamente de forma no enzimática en el ácido. Puesto que el ensayo de TLC es más prolongado que el procedimiento de extracción con cloroformo-metanol, se adoptó este último (como se describe anteriormente para piretroides marcados en el resto ácido) para medir el anión 3-fenoxibenzoato producido a partir de estos sustratos.

Para todos los ensayos, la cantidad molar de producto formado se calculó a partir de la actividad específica conocida del sustrato radiomarcado. Experimentos previos en la esterasa E3WT expresada mostró que la velocidad de hidrólisis fue directamente proporcional a la concentración de 1RS *cis* o 1RS *trans* permetrina en el ensayo hasta 0,5  $\mu\text{M}$ , es decir, no hubo acumulación de complejo de Michaelis. Los ensayos a concentraciones mayores que 0,5  $\mu\text{M}$ , que se aproximan a la solubilidad acuosa publicada de permetrina, dieron resultados irregulares, excluyendo así la medida de  $K_m$  y  $k_{cat}$ . Además, con los sustratos racémicos, la velocidad de hidrólisis se ralentizó drásticamente una vez que se hubo hidrolizado aproximadamente el 50% del sustrato, indicando que sólo uno de los dos enantiómeros (1R o 1S presente en cantidades iguales en una mezcla racémica) se hidrolizó fácilmente, en línea con los datos previamente publicados para una esterasa de áfidos (Devonshire y Moores, 1982). Por lo tanto, las condiciones del ensayo se ajustaron para medir la hidrólisis del enantiómero más fácilmente hidrolizado en capa par. La incubación secuencial de *trans* permetrina con homogenados de E3WT confirmó que ambos mostraron preferencia por el enantiómero 1S *trans*. En todos los casos, la velocidad de hidrólisis a 0,5  $\mu\text{M}$  (o 0,25  $\mu\text{M}$  para un enantiómero en sustratos racémicos), junto con la cantidad molar de esterasa determinada mediante titulación con dECP, se usó para calcular la constante de especificidad ( $k_{cat}/K_m$ ), puesto que no fue posible separar estos parámetros cinéticos. Se supusieron para todas las enzimas y sustratos las mismas consideraciones sobre la solubilidad del sustrato y la proporcionalidad de la respuesta a su concentración.

(c) Cálculo de las constantes de especificidad

La Figura 5 representa los resultados de un experimento en el que se hidrolizaron los isómeros *trans* y *cis* de permetrina mediante la enzima E3W251L.

Puesto que la velocidad de hidrólisis de los isómeros de permetrina fue directamente proporcional a la concentración de sustrato usado hasta 0,5  $\mu\text{M}$  (es decir, no hubo formación significativa del complejo de Michaelis), no fue posible medir  $K_m$  ni  $k_{cat}$  como parámetros independientes. A concentraciones muy por debajo de la  $K_m$ , la ecuación de Michaelis-Menten se simplifica en:

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m} [S] [E]$$

La constante de especificidad (es decir,  $k_{cat}/K_m$ ) se puede calcular por lo tanto a partir de la ecuación anterior usando la velocidad de hidrólisis inicial (pmol/min., calculada a partir de la actividad específica conocida del sustrato radiomarcado) y las concentraciones de sustrato y enzima en el ensayo. El valor máximo limitado por la difusión para una constante de especificidad es  $10^8$ - $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Stryer, 1981).

#### Ejemplo 4: Ensayos de hidrólisis de malatión

La actividad de MCE se ensayó como se describe por Campbell et al. (1998), pero sin diluir la actividad específica de  $^{14}\text{C}$  malatión ( $25 \text{ mCi mmol}^{-1}$ ) para enzimas que parecieran tener una baja  $K_m$ . Este fue un ensayo de punto final en el que malatión se extrajo en una fase orgánica mientras que los ácidos carboxílicos de malatión radiomarcado, los productos de hidrólisis, quedaron en la fase acuosa. La actividad se midió a lo largo del intervalo de 50 nM a 1  $\mu\text{M}$  para determinar  $K_m$  y  $k_{cat}$ , y se analizó mediante regresión no lineal usando el software Enzfitter 1.05 (Elsevier-Biosoft), con resultado gráfico para revelar cualquier desviación de la cinética de Michaelis-Menten. Las constantes de especificidad se calcularon directamente a partir de los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$ .

**Ejemplo 5: Actividad hidrolítica de permetrina de las variantes E3 y EST23**

La Tabla 2 resume los datos cinéticos obtenidos para dieciocho variantes E3 y tres variantes EST23 usando como sustratos *cis*- y *trans*-permetrina. La actividad hidrolítica de malatión de las enzimas también se da para comparación. En cada caso, los datos representan la hidrólisis del enantiómero que se hidroliza el más rápido de cada uno de los pares de isómeros 1S/1R *cis* y 1S/1R *trans* (véase anteriormente).

La enzima E3WT encontrada en moscardas carroñeras susceptibles a OP, y su ortólogo EST23 de *D. melanogaster*, mostraron niveles significativos de actividad hidrolítica de permetrina, que fue específica para los isómeros *trans*. Las enzimas de tipo salvaje mostraron una actividad de al menos un orden de magnitud mayor para malatión (aunque esta actividad elevada de MCE no confiere resistencia a malatión en la moscarda carroñera debido a que la enzima es fácilmente inhibida por el malaoxón producido *in vivo* por la mosca; Campbell et al., 1998). Las mutaciones en las regiones del bolsillo de unión a acilo o del sitio aniónico del sitio activo de la enzima E3 dieron como resultado aumentos significativos en la actividad tanto para los isómeros *trans* como *cis* de permetrina. Estos incrementos en la hidrólisis de permetrina no estuvieron en general correlacionados con incrementos en la actividad hidrolítica de malatión.

## a) Mutaciones del agujero de oxoanión

La mutación E3G137D es responsable de la resistencia a diazinón en la moscarda carroñera de la oveja. En este mutante, el resto Gly neutro, alifático, muy pequeño, en la región de agujero de oxoanión del sitio activo de la enzima se sustituye por un Asp ácido, permitiendo la hidrólisis de una molécula de OP con oxón unido. Sin embargo, este mutante (y su ortólogo de *D. melanogaster*) tuvo actividad reducida para *trans*-permetrina en particular, en comparación con la de la enzima de tipo salvaje. Esta actividad no aumentó por la sustitución de Gly-137 por His o Glu. Sin embargo, la sustitución de Gly-137 por Arg no afectó apreciablemente a la actividad para *cis*- o *trans*-permetrina. La naturaleza lineal de Arg puede significar que se puede doblar fácilmente y no interferir con la unión de permetrina al sitio activo. La actividad de MCE de este grupo de mutantes se correlacionó ampliamente con su actividad para *trans* permetrina en particular, indicando efectos de las sustituciones de G137 en el alojamiento y estabilización del grupo acilo del sustrato. Los efectos son generalmente más pequeños para permetrina que para malatión, pero esto es consistente con el grupo acilo en cierto modo más pequeño para permetrina.

## b) Mutaciones del bolsillo de unión a acilo

La mutación E3W251L, que sustituye el resto Trp aromático grande por el Leu alifático más pequeño en el bolsillo de acilo del sitio activo, dio como resultado un incremento de 7 veces en la hidrólisis de *trans* permetrina, y la adquisición de hidrólisis de *cis*-permetrina sustancial. Esta es la mutación responsable de la adquisición de resistencia a malatión en la moscarda carroñera de la oveja. La actividad de MCE de este mutante fue 2 veces mayor que la de la enzima de tipo salvaje. El efecto de W251L en EST23 fue esencialmente el mismo que para E3. La sustitución de Trp-251 por restos incluso más pequeños en E3 (Thr, Ser, Ala y Gly en orden de tamaño decreciente) también dio como resultado un incremento en la actividad hidrolítica de permetrina, aunque la actividad de estos mutantes no fue tan elevada como la de E3W251L. Claramente, los factores estéricos no son la única consideración en la actividad de los mutantes. Por ejemplo, Thr y Ser contienen ambos grupos hidroxilo, y son hidrófilos. Además, Ala es tanto alifático como hidrófobo (como Leu) e incluso más pequeño que Leu, aunque este mutante fue tan activo para permetrina como el mutante W251L. La abertura del agujero de oxoanión del mutante W251L (es decir, E3P250S/W251L) también disminuyó su actividad tanto para *cis*- como *trans*-permetrina, aunque la actividad fue aún mayor que la del tipo salvaje. Es interesante observar que los incrementos en las constantes de especificidad para permetrina para todos los mutantes W251 en E3 así como W251L en EST23, comparadas con las de los tipos salvajes, fueron uniformemente más pronunciadas para los isómeros *cis*. Mientras que las enzimas de tipo salvaje produjeron relaciones *trans*:*cis* de al menos 20:1, estas relaciones fueron solamente 2-6:1 para los mutantes W251. El espacio extra en el bolsillo de acilo proporcionado por estos mutantes fue aparentemente de muchísimo beneficio para la hidrólisis de los *cis* isómeros de otro modo más problemáticos.

La actividad de MCE de los mutantes E3-251 no se correlacionó con la actividad hidrolítica de permetrina. De este grupo de mutantes, E3W251G tuvo una actividad de MCE aproximadamente 10 veces mayor que la del resto del grupo, y todavía su actividad hidrolítica de permetrina estaba entre las más bajas.

La combinación de las mutaciones tanto W251L como G137D en la misma molécula E3 aumentó la actividad de la enzima para *cis* permetrina con respecto a los niveles del tipo salvaje, pero disminuyó la actividad para *trans*-permetrina y también malatión. Sin embargo, la actividad del mutante doble no fue tan grande como la del mutante que contiene la mutación E3W251L sola (es decir, las mutaciones no actuaron de forma aditiva).

Se sabe que algunas lipasas tienen un resto Leu en la posición correspondiente a Phe 309 en E3 de *L. cuprina*. Por lo tanto, el mutante E3F309L se construyó con el objetivo de conferir actividad para sustratos lipófilos como piretroides. Como se puede ver a partir de la Tabla 2, el mutante E3F309L fue mucho mejor que E3WT para ambos isómeros. Incluso fue más activo para *trans*-permetrina que E3W251L, aunque no tan activo para los isómeros *cis*. Sin embargo, la actividad de MCE de este mutante fue menos de la mitad de la de la enzima de tipo salvaje. La combinación de ambas mutaciones F309L y W251L en la misma molécula de E3 aumentó la actividad para *cis*-



permetrina y disminuyó la actividad para trans-permetrina hasta niveles de E3W251L. En otras palabras, la mutación F309L tuvo muy poco efecto sobre la actividad del mutante W251L para permetrina, pero disminuyó su actividad para malatión.

#### c) Mutaciones del sitio aniónico

5 Se sabe que algunas lipasas tienen un resto Leu en la posición correspondiente a Phe 354 en E3 de *L. cuprina*. Sin embargo, la sustitución de Phe 354 por Leu en E3 no incrementó apreciablemente su actividad para permetrina, pero redujo enormemente su actividad para malatión. La sustitución de Phe 354 por el resto aromático más voluminoso, Trp, por otro lado, incrementó 3-4 veces la actividad tanto para *cis*- como para *trans*-permetrina, pero disminuyó ligeramente la actividad de MCE. Quizá es sorprendente que F354W, no F354L, debería mostrar incrementos en la actividad frente a la permetrina muy lipófila, dado que es un Leu que sustituye a Phe en algunas lipasas de origen natural.

15 Aunque Y148F tiene poca consecuencia para la actividad de MCE, tiene grandes efectos sobre la cinética de la permetrina, y los efectos son opuestos en dirección, dependiendo del antecedente genético. Como mutante individual comparado con el tipo salvaje, muestra una mejora de 5-6 veces de la actividad tanto para *cis* como para *trans* permetrina. Como mutante doble con G137D (que como mutante individual da valores mucho menores para el tipo salvaje), muestra una reducción adicional de dos veces para *trans* permetrina, y casi elimina la actividad para *cis* permetrina. Estos últimos resultados implican claramente una fuerte interacción de Y148 con el agujero de oxoanión con respecto a la hidrólisis de permetrina.

20 Se piensa que Glu-217, el resto inmediatamente adyacente a la serina catalítica, es importante estableciendo el intermedio del estado de transición en reacciones de hidrólisis. Sin embargo, la mutación de este resto a Met (E3E217M), como se encuentra de forma natural en la esterasa E4 del áfido *M. persicae*, tuvo poco efecto sobre la actividad de permetrina, pero redujo enormemente su actividad de MCE.

#### Ejemplo 6: Hidrólisis del análogo de bromo-permetrina

25 La Tabla 2 también resume los datos cinéticos obtenidos para las variantes E3 y EST23 usando los dos análogos *cis*-dibromovinílicos de permetrina (NRDC157). El isómero 1S *cis* de este análogo dibromado de permetrina se hidrolizó con eficacia similar a la 1R/1S *cis* permetrina por todas las enzimas excepto E3F309L y F309L/W251L. Esto indica que los átomos de bromo más grandes no obstruyen sustancialmente el acceso de este sustrato al centro catalítico. Aunque las actividades con las enzimas E3WT y EST23WT fueron demasiado bajas para la comparación significativa entre isómeros, todas las otras enzimas excepto E3F309L y F309L/W251L mostraron una hidrólisis 10 a 100 veces más rápida para el isómero 1S. Esta es la misma preferencia por esta configuración en C1 del anillo ciclopropano como se encuentra previamente para 1S *trans* permetrina en *M. persicae* (Devonshire y Moores, 1982).

35 F309L mostró un efecto drástico sobre la cinética de NRDC157. El mutante individual mostró poca diferencia con respecto al tipo salvaje para 1S *cis*, y el mutante doble con W251L mostró para este isómero menos actividad que W251L solo. Sin embargo, se invirtió la preferencia de 1S/1R, con valores de 0,7:1 en el mutante individual y 0,4:1 en el doble. El resultado es los dos valores más elevados para las actividades de 1R *cis* en todo el conjunto de datos. De hecho, el valor para el mutante doble es alrededor de 10 veces mayor que aquellos para el mutante solo.

#### Ejemplo 7: Hidrólisis de piretroides de tipo II por enzimas expresadas

40 La Tabla 3 resume los datos cinéticos obtenidos para un subconjunto de las variantes E3 y EST23 usando los cuatro isómeros *cis* de deltametrina. Con la excepción de E3W251L y E3F309L, los isómeros 1R *cis* de deltametrina (ya sea  $\alpha$ S o  $\alpha$ R) se hidrolizaron con eficacia similar a 1R *cis* NRDC157 (que se puede considerar intermedio en carácter entre permetrina y deltametrina, por cuanto tiene sustituyente dibromovinílico pero carece del grupo ciano en  $\alpha$ ). La actividad frente a los isómeros 1R *cis* fue siempre mayor con la conformación  $\alpha$ R que con la conformación  $\alpha$ S. E3W251L y E3F309L fueron notablemente menos eficaces con los isómeros 1R *cis* de deltametrina que con los isómeros correspondientes de NRDC157.

## ES 2 389 646 T3

TABLA 2: Constantes de especificidad de variantes naturales y sintéticas de la esterasa E3 de *L. cuprina* y EST23 de *D. melanogaster* para los isómeros *cis* y *trans* de permetrina, malatión y los dos análogos *cis*-dibromovinílicos de permetrina (NRDC157). También se indican las relaciones de las constantes de especificidad para *trans* y *cis* permetrina, y para 1S *cis* y 1R *cis* NRDC157.

Enzima	Constante de especificidad ( $k_{cat}/K_m$ M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> )				
	1S/1R <i>trans</i> - permetrina	1S/1R <i>cis</i> - permetrina ( <i>trans</i> : <i>cis</i> ratio)	malatión	NRDC157 1S <i>cis</i>	NRDC157 1R <i>cis</i> (relación 1S:1R)
E3WT	90000	3400 (27:1)	2600000	4700	630 (8:1)
<i>Mutantes del agujero de oxoanión:</i>					
E3G137D	9600	1800 (5:1)	5100	ND <sup>1</sup>	ND
E3G137R	85000	3900 (22:1)	1200000	ND	ND
E3G137H	26000	1600 (16:1)	8800	ND	ND
E3G137E	2400	280 (9:1)	19000	ND	ND
<i>Mutantes del bolsillo de unión a acilo:</i>					
E3W251L	900000	460000(2:1)	4800000	370000	5400 (68:1)
E3W251S	140000	36000 (4:1)	6500000	35 000	2900 (12:1)
E3W251G	95000	24000 (4:1)	57000000	27000	1700 (16:1)
E3W251T	150000	24000 (6:1)	4500000	24000	900 (26:1)
E3W251A	300000	72000 (4:1)	5400000	67000	1200 (56:1)
E3F309L	1200000	48000 (25:1)	1000000	5700	8000 (0,7:1)
E3W251L/F309L	810000	430 000(2:1)	1400000	26000	69100 (0,4:1)
E3W251L/G137D	24000	11000 (2:1)	60000	12000	1100 (11:1)
E3P250S/W251L	340000	110000 (3:1)	1400000	ND	ND
<i>Mutantes del sitio aniónico:</i>					
E3Y148F	580000	17000 (34:1)	3100000	ND	ND
E3Y148F/G137D	4100	47 (87:1)	12 000	ND	ND
E3E217M	93000	4400 (21:1)	77000	ND	ND
E3F354W	350000	8800 (40:1)	1600000	ND	ND
E3F354L	104400	2700 (38:1)	106000	ND	ND
<i>Enzimas EST23:</i>					
EST23WT	21000	890 (24:1)	2700000	990	330 (3:1)
EST23W251L	260000	160000 (2:1)	2300000	72000	1200 (60:1)
EST23G137D	2500	_ <sup>2</sup>	-	ND	ND

<sup>1</sup> No determinado

<sup>2</sup> No sustancialmente diferente de los valores obtenidos usando extractos celulares de control.

De forma significativa, el mutante 251 con las actividades de deltametrina más elevadas fue W251S, mientras que W251L (la mayor para los otros dos piretroides), y W251G (la mayor para malatión) dieron las actividades de deltametrina más bajas de los cinco mutantes 251. Esto sugiere que el alojamiento del resto ciano en  $\alpha$  del grupo

5 saliente puede ser el impedimento principal para la hidrólisis eficaz de deltametrina, suficiente para evitar cualquier hidrólisis significativa por E3 de tipo salvaje. El alojamiento del sustrato requiere un uso significativamente diferente del espacio en el sitio activo, en comparación con otros sustratos, tal como la sustitución de W251 en el bolsillo de acilo por un resto más pequeño que permite el alojamiento útil, particularmente para los isómeros  $\alpha$ R. Sin embargo, de forma importante, los detalles de los requisitos espaciales, y por lo tanto los mutantes más eficaces, difieren de aquellos para los otros piretroides.

10 La actividad de todas las enzimas con los isómeros 1S *cis* de deltametrina fue drásticamente menor con el isómero correspondiente de NRCC157 que carece del grupo ciano en  $\alpha$ . Esta drástica influencia del grupo ciano en  $\alpha$  parece expresarse con esta conformación 1S en C1 del grupo ciclopropánico. Con la excepción de algunos de los mutantes menos activos, la actividad frente a los isómeros 1S *cis* fue nuevamente siempre mayor con la conformación  $\alpha$ R que con la conformación  $\alpha$ S.

### Ejemplo 8: Discusión general

15 Juntos, los resultados de permetrina y de NRDC157 para los mutantes de la serie 251 generan conclusiones bastante potentes y simples sobre las restricciones de unión a acilo en E3/EST23. En conjunto, como con malatión, las sustituciones de 251, que deberían generar un bolsillo de acilo más espacioso, facilitan el alojamiento/estabilización de los grupos acilo voluminosos de estos sustratos. Estas sustituciones son beneficiosas para la hidrólisis de todos los isómeros

TABLA 3: Constantes de especificidad para los cuatro isómeros *cis* de deltametrina

Enzima	Constante de especificidad ( $k_{cat}/K_m \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ )			
	1S <i>cis</i> $\alpha$ R deltametrina	1S <i>cis</i> $\alpha$ S deltametrina	1R <i>cis</i> $\alpha$ R deltametrina	1R <i>cis</i> $\alpha$ S deltametrina
E3WT	- <sup>1</sup>	-	-	-
E3G137D	-	-	890	560
E3G137R	-	-	670	350
E3G137H	ND	ND	ND	ND
E3G137E	ND	ND	ND	ND
E3W251L	990	880	380	-
E3W251S	4600	2460	ND <sup>2</sup>	ND
E3W251G	700	170	690	350
E3W251T	2900	520	2100	1 300
E3W251A	2000	660	1300	730
E3F309L	2400	810	1600	840
E3W251L/G137D	3600	410	2700	1100
Est23WT	450	750	-	-
Est23W251L	980	550	1000	430

<sup>1</sup> No sustancialmente diferente de los valores obtenidos usando extractos celulares de control

20 <sup>2</sup> No determinado

25 generados mediante los dos estereocentros a lo largo del anillo ciclopropánico. Aunque los isómeros *trans* son fuertemente preferidos por la enzima de tipo salvaje, los mutantes también pueden hidrolizar relativamente bien al menos parte de la mezcla de isómeros *cis*. Sin embargo, en los isómeros *cis*, las mejoras en los mutantes son mucho más notables para los isómeros 1S *cis*. Los isómeros 1R *cis*, que son los más problemáticos de todas las configuraciones para la enzima de tipo salvaje, siguen siendo los más problemáticos para los mutantes. Dentro de la serie de mutantes, las cinéticas mejoradas no se explican simplemente por la reducción en el tamaño de la cadena lateral; la sustitución más pequeña no da las actividades más elevadas, como lo hace para el malatión. De hecho, las mejores cinéticas se obtienen con W251L, aunque Leu tiene el tamaño más grande de cadena lateral de todas las sustituciones ensayadas.

En contraste con los patrones relativamente simples y consistentes observados para permetrina y NRDC157, los resultados de deltametrina para los mutantes de la serie 251 son bastante complejos y difíciles de interpretar. Como se podía esperar a partir de su cinética mejorada para los otros sustratos, no muestran mejores actividades globales que el tipo salvaje para los cuatro isómeros *cis* de deltametrina, aunque, al igual que con el tipo salvaje, son mucho menores en términos absolutos que para los otros sustratos. Sin embargo, la preferencia por los isómeros 1S con respecto a 1R, que es tan fuerte con respecto a NRDC157, es débil en el mejor de los casos en los datos de deltametrina. Por otro lado, hay una clara tendencia a lo largo de todos los mutantes por una preferencia por los isómeros  $\alpha$ R con respecto a los isómeros  $\alpha$ S. Generalmente es sólo del orden de 2:1, pero notablemente es opuesta a la tendencia mostrada por EST23 de tipo salvaje. A primera vista es inesperado que estas presuntas sustituciones del bolsillo de unión a acilo deberían afectar a las estereopreferencias de  $\alpha$ R/ $\alpha$ S, debido a que esto último se aplica al resto ciano en  $\alpha$  en el grupo saliente (alcohol) del sustrato.

En conjunto, los datos de F309L muestran claramente un efecto importante de este resto sobre la cinética de la hidrólisis de piretroides. En un nivel, son paralelos a los resultados para los mutantes de la serie W251, mostrando ambos conjuntos de datos una cinética mejorada consistente con las expectativas basadas en la provisión de un mayor espacio en el bolsillo de unión a acilo. Sin embargo, hay también diferencias importantes, siendo la serie W251 desproporcionadamente activa para los isómeros *cis* frente a *trans* de permetrina, y F309L desproporcionadamente activa con los isómeros 1R frente a 1S de *cis* NRDC157. Las sustituciones en los dos sitios también muestran fuertes interacciones, consistentes con ellas contribuyendo a una estructura y función compartidas en el bolsillo de unión a acilo. Por ejemplo, tanto la mejora desproporcionada de los mutantes W251 para *cis* permetrina como la mejora desproporcionada de F309L para 1R *cis* NRDC157 se comportan como caracteres dominantes en el mutante doble. Los mutantes 251 y 309 tienen efectos potenciadores cuantitativamente similares sobre las actividades, y las mismas estereoespecificidades con respecto a la hidrólisis de deltametrina, y no se observan las diferencias estereoespecíficas observadas con los piretroides más pequeños. Sin embargo, se argumenta que el volumen adicional del resto ciano en  $\alpha$  en su grupo saliente requiere una redistribución radical del espacio a lo largo del sitio activo de manera que se ignoran las estereoespecificidades evidentes con los piretroides más pequeños.

#### Referencias:

Broomfield, C.A. (1999). *Chemico-Biological Interactions* 120: 251-256.

Campbell, P.M., Harcourt, R.L., Crone, E.J., Claudianos, C., Hammock, B.D., Russell, R.J. y Oakeshott, J.G. (2001) *Insect Biochem Molec Biol* 31:513-520.

Campbell, P.M., Newcomb, R.D., Russell, R.J. y Oakeshott, J.G. (1998a) *Insect Biochem Molec Biol* 28, 139-150.

Campbell, P.M., Yen, J.L., Masoumi, A., Russell, R.J., Batterham, P., McKenzie, J.A., y Oakeshott, J.G. (1998b) *J. Econ. Entomol.* 91:367-375.

Claudianos, C., Crone, E., Coppin, C., Russell, R. y Oakeshott, J. (2002) En: Marshall Clark, J. y Yamagushi, I., (Eds.) *Agrochemical Resistance: Extent, Mechanism and Detection*. (in press)

Claudianos, C., Russell, R.J. y Oakeshott, J.G. (1999) *Insect Biochem Molec Biol* 29, 675-86.

Cyglar, M. y Schrag, J.D. (1997) *Methods Enzymol* 284, 3-27.

Derewenda, U., Brzozwski, A.M., Lawson, D.M., Derewenda, Z.S. (1992) *Biochemistry* 31:1532-1541.

Devonshire, A.L., Heidari, R., Bell, K.L., Campbell, P.M., Campbell, B.E., Odgers, W.A., Oakeshott, J.G. y Russell, R.J. *Kinetic Efficiency of Mutant Carboxylesterases Implicated in Organophosphate Insecticide Resistance*. (en preparación)

Devonshire, A.L. y Moores, G.D. (1982) *Pestic. Biochem. Physiol.* 18, 235-246.

Fournier, D., Bride, J.-M., Hoffmann, F. y Karch, F. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 14270-14274.

Gordon, R.K., Feaster, S.R., Russell, A.J., LeJeune, K.E., Maxwell, M.D., Lenz, D.E., Ross, M. y Doctor, B.P. (1999) *Chem Biol Interact* 14, 463-70.

Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B., Cyglar, M. (1993). *J Biol Chem* 268, 12843-12847.

Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T.L., Mallender, W.D., Lewis, T., Fletcher, R.J., Guss, M., Silman, I. y Sussman, J.L. (2000) *Protein Science* 9, 1063-1072.

Järv, J. (1984) *Bioorganic Chemistry* 12, 259-278.

- Koellner, G., Kryger, G., Millard, C.B., Silman, I., Sussman, J.L. y Steiner, T. (2000) *The Journal of Molecular Biology* 296, 713-735.
- LeJuene, K.E., Wild, J.R. y Russell, A.J. (1998) *Nature* 395, 27-8.
- 5 Martinez, C., Nicolas, A., van Tilbeurgh, H., Egloff, M.P., Cudrey, C., Verger, R. y Cambillau, C. (1994) *Biochemistry* 33, 83-9.
- Myers, M.A., Healy, M.J. y Oakeshott, J.G. (1993) *Biochem Genet* 31, 259-78.
- Nair, H.K., Seravalli, J., Arbuckle, T. y Quinn, D.M. (1994) *Biochemistry* 33, 8566-76.
- Needleman, S.B. y Wunsch, C.D. (1970) *J Mol Biol* 48, 443-53.
- 10 Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Ollis, D.L., Cheah, E., Russell, R.J. y Oakeshott, J.G. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7464-8.
- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Russell, R.J. y Robin, G.C. (1999) *BioEssays* 21, 1031-42.
- Oakeshott, J.G., van Papenrecht, E.A., Boyce, T.M., Healy, M.J. y Russell, R.J. (1993) *Genetica* 90, 239-268.
- Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Ariel, N., Segal, Y., Velan, B. y Shaferman, A. (1998) *The Journal of Biological Chemistry* 273, 19509-19517.
- 15 Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Ariel, N., Segal, Y., Velan, B. y Shaferman, A. (1996) *The Journal of Biological Chemistry* 271, 11953-11962.
- Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Ariel, N., Segal, Y., Velan, B. y Shaferman, A. (1995) *The Journal of Biological Chemistry* 270, 2082-2091.
- 20 Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M., Segal, Y., Ariel, N., Cohen, S., Velan, B. y Shafferman, A. (1993) *The Journal of Biological Chemistry* 268, 17083-17095.
- Patten, P.A., Howard, R.J. y Stemmer, W.P. (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8, 724-33.
- Petrikovics, I., Cheng, T.C., Papahadjopoulos, D., Hong, K., Yin, R., DeFrank, J.J., Jaing, J., Zong, Z.H., McGuinn, W.D., Sylvester, D., Pei, L., Madec, J., Tamulinas, C., Jaszberenyi, J.C., Barcza, T. y Way, J.L. (2000a) *Toxicol Sci* 57, 16-21.
- 25 Petrikovics, I., McGuinn, W.D., Sylvester, D., Yuzapavik, P., Jaing, J., Way, J.L., Papahadjopoulos, D., Hong, K., Yin, R., Cheng, T.C., y DeFrank, J.J. (2000b) *Drug Delivery* 7: 83-89.
- Qian, N. y Kovach, I.M. (1993) *FEBS Lett* 336, 263-6.
- Robin, C., R. J. Russell, K. M. Medveczky, y J. G. Oakeshott. (1996) *J Mol Evol* 43:241-52.
- 30 Shafferman, A., Velan, B., Orentlich, A., Kronman, C., Grosfeld, H., Leitner, M., Flachner, Y., Cohen, S., Barak, D. y Ariel, N. (1992) *EMBO J.* 11, 3561-3568.
- Stryer, L. (1981) *Biochemistry*. p. 115, W.H. Freeman, San Francisco.
- Sussman, J.S., Harel, M., Frolov, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. y Silman, I. (1991) *Science* 253, 872-879.
- Thomas, B.A., Church, W.B., Lane, T.R. y Hammock, B.D. (1999) *Proteins* 34, 184-96.
- 35 Villatte, F., Ziliani, P., Marcel, V., Menozzi, P. y Fournier, D. (2000) *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95-102.
- Walsh, S.B., Dolden, T.A., Moores, G.D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A.L. y Williamson, M.S. (2001) *Biochem J* 359, 175-81.
- Yao, H., Chunling, Q., Williamson, M.S. y Devonshire, A.L. (1997) *Clin. J. Biotechnol.* 13:177-183.
- Zhu, Y.-C., Dowdy, A.K. y Baker, J.E. (1999) *Insect Biochem Molec. Biol.* 29:417-425.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

<120> Degradación de plaguicidas y toxinas de ésteres hidrófobos

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

5 <210> 1

<211>570

<212> PRT

<213> Lucilia cuprina

<400> 1

Met Asn Phe Asn Val Ser Leu Met Glu Lys Leu Lys Trp Lys Ile Lys  
1 5 10 15

Cys Ile Glu Asn Lys Phe Leu Asn Tyr Arg Leu Thr Thr Asn Glu Thr  
20 25 30

Val Val Ala Glu Thr Glu Tyr Gly Lys Val Lys Gly Val Lys Arg Leu  
35 40 45

Thr Val Tyr Asp Asp Ser Tyr Tyr Ser Phe Glu Gly Ile Pro Tyr Ala  
50 55 60

Gln Pro Pro Val Gly Glu Leu Arg Phe Lys Ala Pro Gln Arg Pro Thr  
65 70 75 80

Pro Trp Asp Gly Val Arg Asp Cys Cys Asn His Lys Asp Lys Ser Val  
85 90 95

Gln Val Asp Phe Ile Thr Gly Lys Val Cys Gly Ser Glu Asp Cys Leu  
100 105 110

10

ES 2 389 646 T3

Tyr Leu Ser Val Tyr Thr Asn Asn Leu Asn Pro Glu Thr Lys Arg Pro  
 115 120 125

Val Leu Val Tyr Ile His Gly Gly Gly Phe Ile Ile Gly Glu Asn His  
 130 135 140

Arg Asp Met Tyr Gly Pro Asp Tyr Phe Ile Lys Lys Asp Val Val Leu  
 145 150 155 160

Ile Asn Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ala Leu Gly Phe Leu Ser Leu Asn  
 165 170 175

Ser Glu Asp Leu Asn Val Pro Gly Asn Ala Gly Leu Lys Asp Gln Val  
 180 185 190

Met Ala Leu Arg Trp Ile Lys Asn Asn Cys Ala Asn Phe Gly Gly Asn  
 195 200 205

Pro Asp Asn Ile Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ala Ser Thr  
 210 215 220

His Tyr Met Met Leu Thr Glu Gln Thr Arg Gly Leu Phe His Arg Gly  
 225 230 235 240

Ile Leu Met Ser Gly Asn Ala Ile Cys Pro Trp Ala Asn Thr Gln Cys  
 245 250 255

Gln His Arg Ala Phe Thr Leu Ala Lys Leu Ala Gly Tyr Lys Gly Glu  
 260 265 270

Asp Asn Asp Lys Asp Val Leu Glu Phe Leu Met Lys Ala Lys Pro Gln  
 275 280 285

Asp Leu Ile Lys Leu Glu Glu Lys Val Leu Thr Leu Glu Glu Arg Thr  
 290 295 300

Asn Lys Val Met Phe Pro Phe Gly Pro Thr Val Glu Pro Tyr Gln Thr  
 305 310 315 320

Ala Asp Cys Val Leu Pro Lys His Pro Arg Glu Met Val Lys Thr Ala  
 325 330 335

Trp Gly Asn Ser Ile Pro Thr Met Met Gly Asn Thr Ser Tyr Glu Gly  
 340 345 350

ES 2 389 646 T3

Leu Phe Phe Thr Ser Ile Leu Lys Gln Met Pro Met Leu Val Lys Glu  
 355 360 365

Leu Glu Thr Cys Val Asn Phe Val Pro Ser Glu Leu Ala Asp Ala Glu  
 370 375 380

Arg Thr Ala Pro Glu Thr Leu Glu Met Gly Ala Lys Ile Lys Lys Ala  
 385 390 395 400

His Val Thr Gly Glu Thr Pro Thr Ala Asp Asn Phe Met Asp Leu Cys  
 405 410 415

Ser His Ile Tyr Phe Trp Phe Pro Met His Arg Leu Leu Gln Leu Arg  
 420 425 430

Phe Asn His Thr Ser Gly Thr Pro Val Tyr Leu Tyr Arg Phe Asp Phe  
 435 440 445

Asp Ser Glu Asp Leu Ile Asn Pro Tyr Arg Ile Met Arg Ser Gly Arg  
 450 455 460

Gly Val Lys Gly Val Ser His Ala Asp Glu Leu Thr Tyr Phe Phe Trp  
 465 470 475 480

Asn Gln Leu Ala Lys Arg Met Pro Lys Glu Ser Arg Glu Tyr Lys Thr  
 485 490 495

Ile Glu Arg Met Thr Gly Ile Trp Ile Gln Phe Ala Thr Thr Gly Asn  
 500 505 510

Pro Tyr Ser Asn Glu Ile Glu Gly Met Glu Asn Val Ser Trp Asp Pro  
 515 520 525

Ile Lys Lys Ser Asp Glu Val Tyr Lys Cys Leu Asn Ile Ser Asp Glu  
 530 535 540

Leu Lys Met Ile Asp Val Pro Glu Met Asp Lys Ile Lys Gln Trp Glu  
 545 550 555 560

Ser Met Phe Glu Lys His Arg Asp Leu Phe  
 565 570

<210> 2

<211> 572

<212> PRT



ES 2 389 646 T3

<213> Drosophila melanogaster

<400> 2

Met Asn Lys Asn Leu Gly Phe Val Glu Arg Leu Arg Gly Arg Leu Lys  
1                                   5                                   10                                   15

Thr Ile Glu His Lys Val Gln Gln Tyr Arg Gln Ser Thr Asn Glu Thr  
                                  20                                   25                                   30

Val Val Ala Asp Thr Glu Tyr Gly Gln Val Arg Gly Ile Lys Arg Leu  
                                  35                                   40                                   45

Ser Leu Tyr Asp Val Pro Tyr Phe Ser Phe Glu Gly Ile Pro Tyr Ala  
50                                   55                                   60

Gln Pro Pro Val Gly Glu Leu Arg Phe Lys Ala Pro Gln Arg Pro Ile  
65                                   70                                   75                                   80

Pro Trp Glu Gly Val Arg Asp Cys Ser Gln Pro Lys Asp Lys Ala Val  
                                  85                                   90                                   95

Gln Val Gln Phe Val Phe Asp Lys Val Glu Gly Ser Glu Asp Cys Leu  
                                  100                                   105                                   110

Tyr Leu Asn Val Tyr Thr Asn Asn Val Lys Pro Asp Lys Ala Arg Pro  
                                  115                                   120                                   125

Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Phe Ile Ile Gly Glu Ala Asn  
130                                   135                                   140

Arg Glu Trp Tyr Gly Pro Asp Tyr Phe Met Lys Glu Asp Val Val Leu  
145                                   150                                   155                                   160

Val Thr Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ala Leu Gly Phe Met Ser Leu Lys  
                                  165                                   170                                   175

Ser Pro Glu Leu Asn Val Pro Gly Asn Ala Gly Leu Lys Asp Gln Val  
                                  180                                   185                                   190

Leu Ala Leu Lys Trp Ile Lys Asn Asn Cys Ala Ser Phe Gly Gly Asp  
195                                   200                                   205

ES 2 389 646 T3

Pro Asn Cys Ile Thr Val Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Thr  
 210 215 220  
 His Tyr Met Met Leu Thr Asp Gln Thr Gln Gly Leu Phe His Arg Gly  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Gln Ser Gly Ser Ala Ile Cys Pro Trp Ala Tyr Asn Gly Asp  
 245 250 255  
 Ile Thr His Asn Pro Tyr Arg Ile Ala Lys Leu Val Gly Tyr Lys Gly  
 260 265 270  
 Glu Asp Asn Asp Lys Asp Val Leu Glu Phe Leu Gln Asn Val Lys Ala  
 275 280 285  
 Lys Asp Leu Ile Arg Val Glu Glu Asn Val Leu Thr Leu Glu Glu Arg  
 290 295 300  
 Met Asn Lys Ile Met Phe Arg Phe Gly Pro Ser Leu Glu Pro Phe Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Pro Glu Cys Val Ile Ser Lys Pro Pro Lys Glu Met Met Lys Thr  
 325 330 335  
 Ala Trp Ser Asn Ser Ile Pro Met Phe Ile Gly Asn Thr Ser Tyr Glu  
 340 345 350  
 Gly Leu Leu Trp Val Pro Glu Val Lys Leu Met Pro Gln Val Leu Gln  
 355 360 365  
 Gln Leu Asp Ala Gly Thr Pro Phe Ile Pro Lys Glu Leu Leu Ala Thr  
 370 375 380  
 Glu Pro Ser Lys Glu Lys Leu Asp Ser Trp Ser Ala Gln Ile Arg Asp  
 385 390 395 400  
 Val His Arg Thr Gly Ser Glu Ser Thr Pro Asp Asn Tyr Met Asp Leu  
 405 410 415  
 Cys Ser Ile Tyr Tyr Phe Val Phe Pro Ala Leu Arg Val Val His Ser  
 420 425 430  
 Arg His Ala Tyr Ala Ala Gly Ala Pro Val Tyr Phe Tyr Arg Tyr Asp  
 435 440 445

ES 2 389 646 T3

Phe Asp Ser Glu Glu Leu Ile Phe Pro Tyr Arg Ile Met Arg Met Gly  
 450 455 460

Arg Gly Val Lys Gly Val Ser His Ala Asp Asp Leu Ser Tyr Gln Phe  
 465 470 475 480

Ser Ser Leu Leu Ala Arg Arg Leu Pro Lys Glu Ser Arg Glu Tyr Arg  
 485 490 495

Asn Ile Glu Arg Thr Val Gly Ile Trp Thr Gln Phe Ala Ala Thr Gly  
 500 505 510

Asn Pro Tyr Ser Glu Lys Ile Asn Gly Met Asp Thr Leu Thr Ile Asp  
 515 520 525

Pro Val Arg Lys Ser Asp Glu Val Ile Lys Cys Leu Asn Ile Ser Asp  
 530 535 540

Asp Leu Lys Phe Ile Asp Leu Pro Glu Trp Pro Lys Leu Lys Val Trp  
 545 550 555 560

Glu Ser Leu Tyr Asp Asp Asn Lys Asp Leu Leu Phe  
 565 570

<210> 3

<211> 576

<212> PRT

5 <213> Torpedo californica

<400> 3

Ala Asp Asp Asp Ser Glu Leu Leu Val Asn Thr Lys Ser Gly Lys Val  
 1 5 10 15

Met Arg Thr Arg Ile Pro Val Leu Ser Ser His Ile Ser Ala Phe Leu  
 20 25 30

Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro Val Gly Asn Met Arg Phe Arg Arg  
 35 40 45

Pro Glu Pro Lys Lys Pro Trp Ser Gly Val Trp Asn Ala Ser Thr Tyr  
 50 55 60

ES 2 389 646 T3

Pro Asn Asn Cys Gln Gln Tyr Val Asp Glu Gln Phe Pro Gly Phe Pro  
65 70 75 80

Gly Ser Glu Met Trp Asn Pro Asn Arg Glu Met Ser Glu Asp Cys Leu  
85 90 95

Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Ser Pro Arg Pro Lys Ser Ala Thr Val  
100 105 110

Met Leu Trp Ile Tyr Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Gly Ser Ser Thr Leu  
115 120 125

Asp Val Tyr Asn Gly Lys Tyr Leu Ala Tyr Thr Glu Glu Val Val Leu  
130 135 140

Val Ser Leu Ser Tyr Arg Val Gly Ala Phe Gly Phe Leu Ala Leu His  
145 150 155 160

Gly Ser Gln Glu Ala Pro Gly Asn Met Gly Leu Leu Asp Gln Arg Met  
165 170 175

Ala Leu Gln Trp Val His Asp Asn Ile Gln Phe Phe Gly Gly Asp Pro  
180 185 190

Lys Thr Val Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala Gly Arg Ala Ser Val Gly  
195 200 205

Met His Ile Leu Ser Pro Gly Ser Arg Asp Leu Phe Arg Arg Ala Ile  
210 215 220

Leu Gln Ser Gly Ser Pro Asn Cys Pro Trp Ala Ser Val Ser Val Ala  
225 230 235 240

Glu Gly Arg Arg Arg Ala Val Glu Leu Arg Arg Asn Leu Asn Cys Asn  
245 250 255

Leu Asn Ser Asp Glu Asp Leu Ile Gln Cys Leu Arg Glu Lys Lys Pro  
260 265 270

Gln Glu Leu Ile Asp Val Glu Trp Asn Val Leu Pro Phe Asp Ser Ile  
275 280 285

Phe Arg Phe Ser Phe Val Pro Val Ile Asp Gly Glu Phe Phe Pro Thr  
290 295 300

ES 2 389 646 T3

Ser Leu Glu Ser Met Leu Asn Ala Gly Asn Phe Lys Lys Thr Gln Ile  
 305 310 315 320

Leu Leu Gly Val Asn Lys Asp Glu Gly Ser Phe Phe Leu Leu Tyr Gly  
 325 330 335

Ala Pro Gly Phe Ser Lys Asp Ser Glu Ser Lys Ile Ser Arg Glu Asp  
 340 345 350

Phe Met Ser Gly Val Lys Leu Ser Val Pro His Ala Asn Asp Leu Gly  
 355 360 365

Leu Asp Ala Val Thr Leu Gln Tyr Thr Asp Trp Met Asp Asp Asn Asn  
 370 375 380

Gly Ile Lys Asn Arg Asp Gly Leu Asp Asp Ile Val Gly Asn His Asn  
 385 390 395 400

Val Ile Cys Pro Leu Met His Phe Val Asn Lys Tyr Thr Lys Phe Gly  
 405 410 415

Asn Gly Thr Tyr Leu Tyr Phe Phe Asn His Arg Ala Ser Asn Leu Val  
 420 425 430

Trp Pro Glu Trp Met Gly Val Ile His Gly Tyr Glu Ile Glu Phe Val  
 435 440 445

Phe Gly Leu Pro Leu Val Lys Glu Leu Asn Tyr Thr Ala Glu Glu Glu  
 450 455 460

Ala Leu Ser Arg Arg Ile Met His Tyr Trp Ala Thr Phe Ala Lys Thr  
 465 470 475 480

Gly Asn Pro Asn Glu Pro His Ser Gln Glu Ser Lys Trp Pro Leu Phe  
 485 490 495

Thr Thr Lys Glu Gln Lys Phe Ile Asp Leu Asn Thr Glu Pro Ile Lys  
 500 505 510

Val His Gln Arg Leu Arg Val Gln Met Cys Val Phe Trp Asn Gln Phe  
 515 520 525

Leu Pro Lys Leu Leu Asn Ala Thr Glu Thr Ile Asp Glu Ala Glu Arg  
 530 535 540

ES 2 389 646 T3

Gln Trp Lys Thr Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Met His Trp  
545 550 555 560

Lys Asn Gln Phe Asp Gln Tyr Ser Arg His Glu Asn Cys Ala Glu Leu  
565 570 575

## REIVINDICACIONES

1. Un método para eliminar o reducir la concentración de un piretroide en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero, o un mutante de la misma, en el que la  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero, o un mutante de la misma, comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 5           i) una secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1,
- ii) una secuencia como se muestra en SEC ID NO: 2, y
- iii) una secuencia que es al menos 80% idéntica a i) o ii) que es capaz de hidrolizar un piretroide.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la secuencia es al menos 90% idéntica a i) o ii).
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la  $\alpha$ -carboxilesterasa mutante de díptero tiene una mutación o mutaciones en las regiones del agujero de oxoanión, del bolsillo de unión a acilo o del sitio aniónico de un sitio activo de la esterasa, o cualquier combinación de las mismas.
- 10           4. El método de la reivindicación 3, en el que la  $\alpha$ -carboxilesterasa mutante de díptero comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 15           i) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que la glicina en el resto de aminoácido número 137 se sustituye por una arginina o una histidina,
- ii) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que el triptófano en el resto de aminoácido número 251 se sustituye por una leucina, serina, glicina, treonina, o alanina,
- iii) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que el triptófano en el resto de aminoácido número 251 se sustituye por una leucina, y la fenilalanina en el resto de aminoácido número 309 se sustituye por una leucina,
- 20           iv) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que el triptófano en el resto de aminoácido número 251 se sustituye por una leucina, y la glicina en el resto de aminoácido número 137 se sustituye por un ácido aspártico,
- v) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que el triptófano en el resto de aminoácido número 251 se sustituye por una leucina, y la prolina en el resto de aminoácido número 250 se sustituye por una serina,
- 25           vi) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que la fenilalanina en el número de aminoácido 309 se sustituye por una leucina,
- vii) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que la tirosina en el número de aminoácido 148 se sustituye por una fenilalanina,
- 30           viii) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que el ácido glutámico en el número de aminoácido 217 se sustituye por una metionina,
- ix) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que la fenilalanina en el número de aminoácido 354 se sustituye por un triptófano, o una leucina, y
- 35           x) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 2, en la que el triptófano en el resto de aminoácido número 251 se sustituye por una leucina.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el método se lleva a cabo usando dos o más  $\alpha$ -carboxilesterasas de díptero, o mutantes de las mismas.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el piretroide es un piretroide de Tipo I o Tipo II.
- 40           7. El método de la reivindicación 6, en el que el piretroide de Tipo I se selecciona del grupo que consiste en: 1S/1R trans permetrina, 1S/1R cis permetrina, NRDC157 1S cis, y NRDC157 1R cis.
8. El método de la reivindicación 6, en el que el piretroide de Tipo II es deltametrina.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el método se lleva a cabo en un entorno que contiene líquido.
- 45           10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero, o mutante de la misma, se proporciona directamente a la muestra.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero, o mutante de la misma, se proporciona a la muestra mediante expresión de un polinucleótido que codifica la  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero, o mutante de la misma, a partir de una célula hospedante que comprende el polinucleótido.
- 5 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero, o mutante de la misma, se proporciona como una esponja polimérica o espuma, comprendiendo la espuma o esponja la  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero, o mutante de la misma, inmovilizada sobre un soporte poroso polimérico.
13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el método comprende además la presencia de un tensioactivo cuando el piretroide se pone en contacto con la  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero, o mutante de la misma.
- 10 14. El método de la reivindicación 13, en el que el tensioactivo es un biotensioactivo.
15. Un método para seleccionar una enzima que hidroliza un piretroide, comprendiendo el método
- (a) introducir una o más mutaciones en una  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero, o una  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero que ya se ha mutado, y
- 15 (b) determinar la capacidad de la  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero mutante para hidrolizar un piretroide, en el que la  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero, o un mutante de la misma, comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- i) una secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1,
- ii) una secuencia como se muestra en SEC ID NO: 2, y
- 20 iii) una secuencia que es al menos 80% idéntica a i) o ii).
16. El método de la reivindicación 15, en el que la secuencia es al menos 90% idéntica a i) o ii).
17. El método de la reivindicación 15 o de la reivindicación 16, en el que la una o más mutaciones mejora la actividad hidrolítica y/o altera la estereoespecificidad de la esterasa.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que la una o más mutaciones están en una región de la esterasa seleccionada del grupo que consiste en: agujero de oxoanión, bolsillo de unión a acilo, y sitio aniónico.
- 25 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que la mutación es una mutación de punto.
20. El método de la reivindicación 15, en el que la  $\alpha$ -carboxilesterasa de díptero que ya se ha mutado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 30 i) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que la glicina en el resto de aminoácido número 137 se sustituye por una arginina o una histidina,
- ii) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que el triptófano en el resto de aminoácido número 251 se sustituye por una leucina, serina, glicina, treonina, o alanina,
- 35 iii) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que el triptófano en el resto de aminoácido número 251 se sustituye por una leucina, y la fenilalanina en el resto de aminoácido número 309 se sustituye por una leucina,
- iv) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que el triptófano en el resto de aminoácido número 251 se sustituye por una leucina, y la glicina en el resto de aminoácido número 137 se sustituye por un ácido aspártico,
- 40 v) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que el triptófano en el resto de aminoácido número 251 se sustituye por una leucina, y la prolina en el resto de aminoácido número 250 se sustituye por una serina,
- vi) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que la fenilalanina en el número de aminoácido 309 se sustituye por una leucina,
- 45 vii) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que la tirosina en el número de aminoácido 148 se sustituye por una fenilalanina,



## ES 2 389 646 T3

viii) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que el ácido glutámico en el número de aminoácido 217 se sustituye por una metionina,

ix) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 1, en la que la fenilalanina en el número de aminoácido 354 se sustituye por un triptófano, o una leucina, y

5

x) la secuencia como se muestra en SEC ID NO: 2, en la que el triptófano en el resto de aminoácido número 251 se sustituye por una leucina.

ES 2 389 646 T3

E3 1 MNFNVSLMEKLLKWKIKCIENKFLNYRLTTNETVVAETEGKVKGVKRLTVYDDSYYSFEG  
AChE 1 ..... ADDSELLVNTKSGKVMRT.RIPVLSSHISAF LG

E3 61 IPYAQPPVGELRFKAPQRPTPWDGVRDCCNHKDKS...VQVDFIT.....G.KVCGSE  
AChE 34 IPFAEPPVGNMRFRRPEPKPWSGVWNASTYPNNCQQYVDEQFPGFPGSEMWNPNREMSE

E3 110 DCLYLSVYTNNLNPETK...RVLVYIHGGGFIIGENHRDMYGPDYFI.KKDVLINI Q  
AChE 94 DCLYLNIVVPSRPK SAT.....VMLWIYGGGFYSGSSTLDVYNGKYLAYTEEVVLSLS

E3 165 YRLGALGFSLNSEDLNVPGNAGLKDQVMALRWIKNNCANFGGNPDNITVFGESAGAAS T  
AChE 149 YRVGAFGFALHGSQEA.PGNMGLLDQRMALQVWHDNIQFFGGDPKTVT LFGESAGRASV

E3 225 HYMMLTEQTRGLFHRGILMSGNAICPWANTQ.CQHRAFTLAKLAGYKGEDNDKD.VLEFL  
AChE 208 GMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPNCPWASVSVAEGRRRRAVELRRNLNCNLNSDEDLIQCL

E3 283 MKAKPQDLIKLEEKVLTLEERTNKVMFPFGPTVEPYQTADCVLPKHPREMVKTAWGNSIP  
AChE 268 REKKPQELIDVE...WNVLPFDSIFRFSFVVID.....GEFFPTSLESMLNAGNFKKTQ

E3 343 TMMGNTSYEGLFFTSILKQMPMLVKELET CVNFVPS ELADAERTAPET...LEMGAKIKK  
AChE 320 ILLGVNKDEGSFF..ILYGAPGF SKDSESKIS.REDFMSGVKLSVPHANDLGLDAVTLQY

E3 400 AHVTGET...PTADNFMDLCSHIYFWFPMHRLQLRFNHTSGTPVYLYRFDFDSEDLINP  
AChE 377 TDWMDNNGIKNRDGLDDIVGNHNVICPLMHFVNKYTKFGNGTYLYFFNHR.ASNLVWPE

E3 457 YRIMRSGRGVKGVSHADELTYFFWNQLAKRMPKESREYKTIERMTGIWIQFATTGNPYSN  
AChE 436 WM.....GVIHGYEIEFVFG LPLVKELNYTAE EALSRRIMHYWATFAKTGNPNEP

E3 517 EIEG.....MENVSWDPIKKS D....EVYKCLNISDELKMIDVPEMDK.IKQW  
AChE 487 HSQESKWPLFTTKEQKFIDLNTEPIKVHQR LRVQMCVFWNQFLPKLLNATETIDEAERQW

E3 560 ESMFEKHRDLF\*.....  
AChE 547 KTEFHRWSSYMMHWKNQFDQYSRHENCAEL

Figura 1

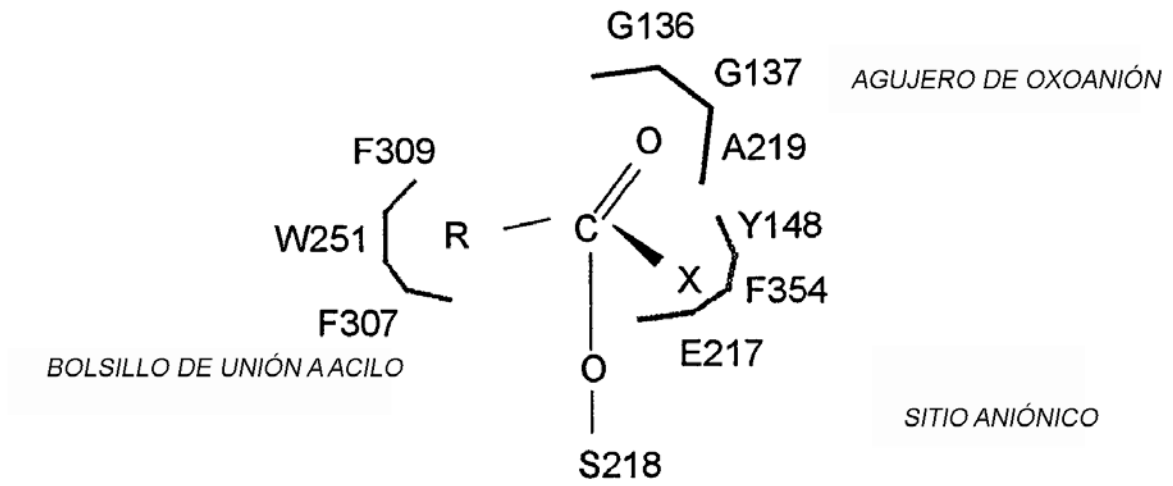


Figura 2

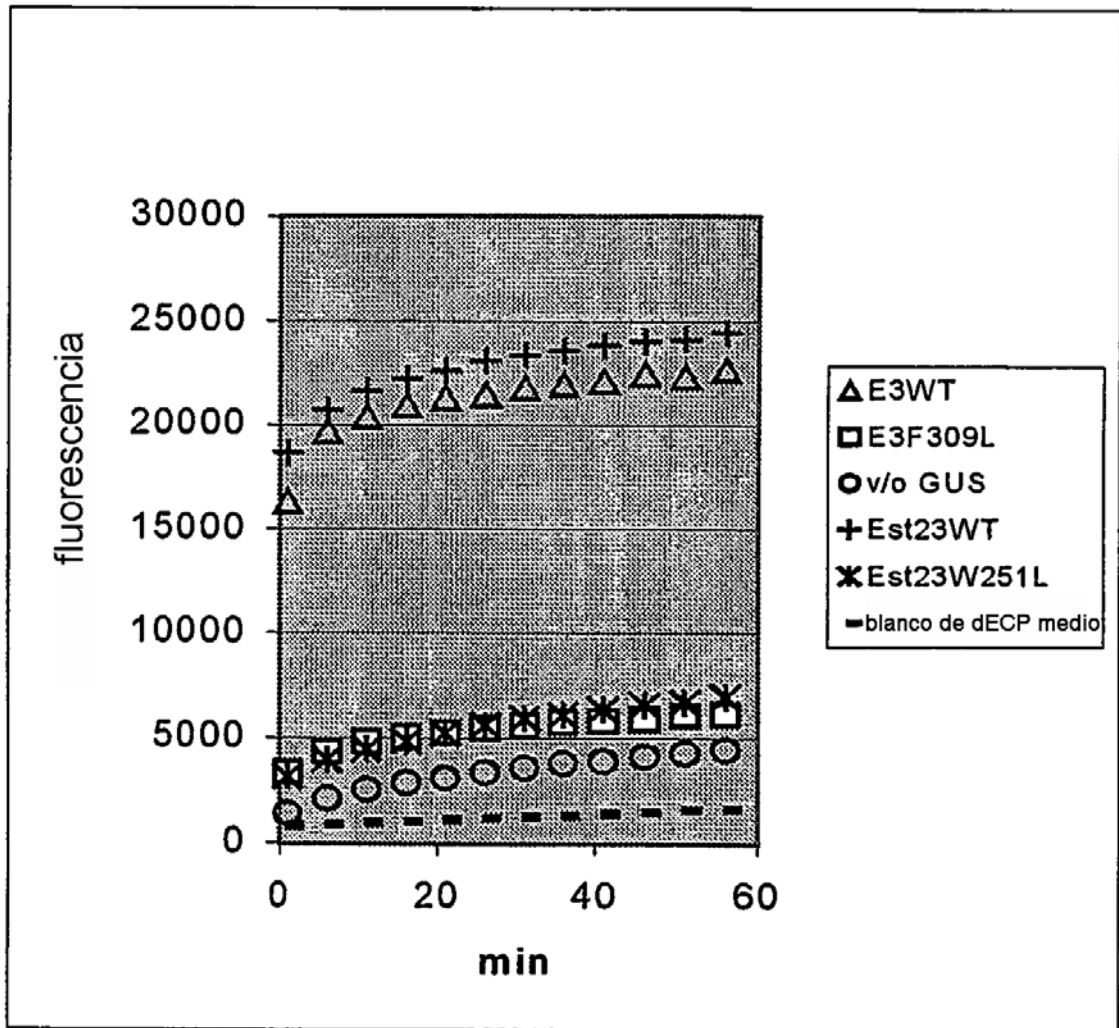


Figura 3

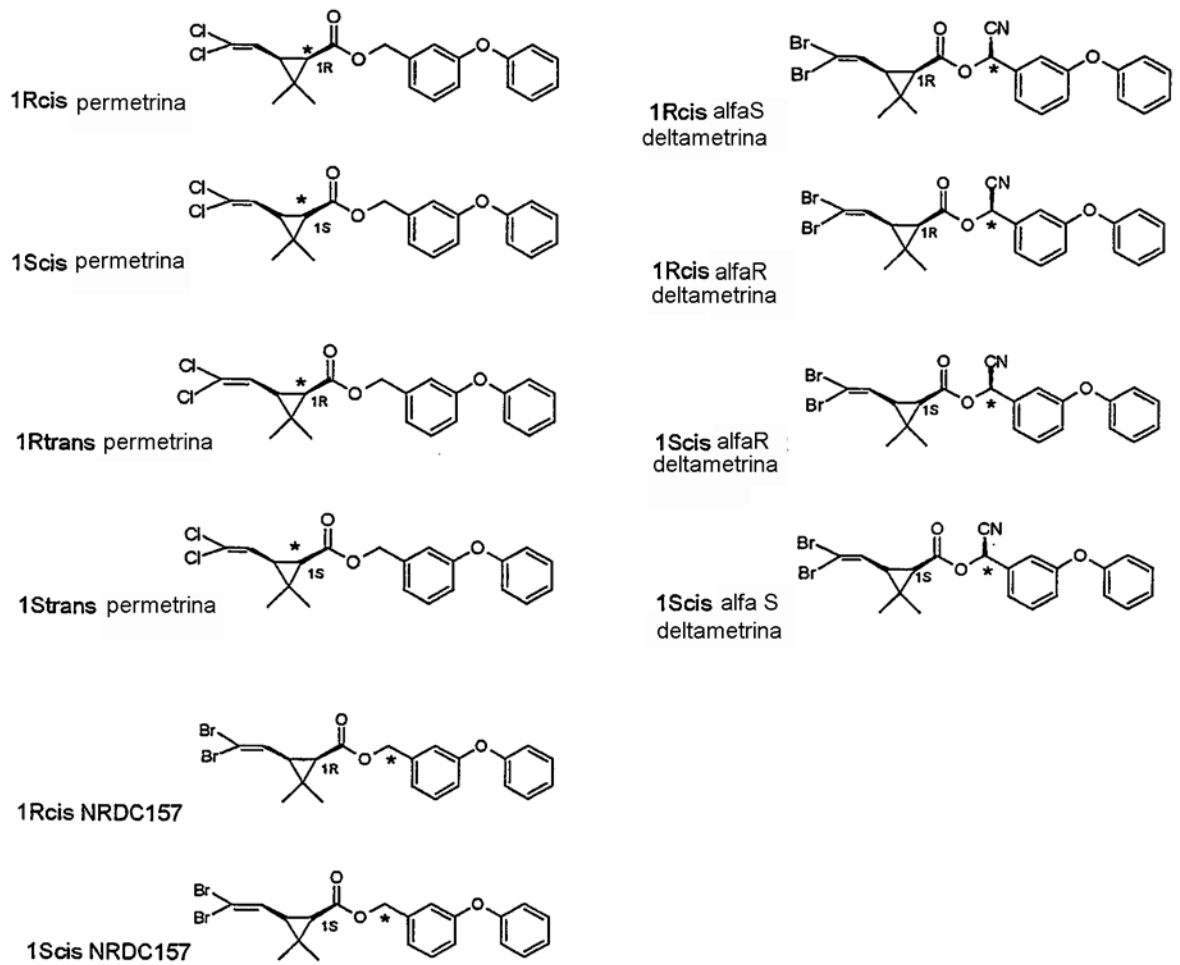


Figura 4

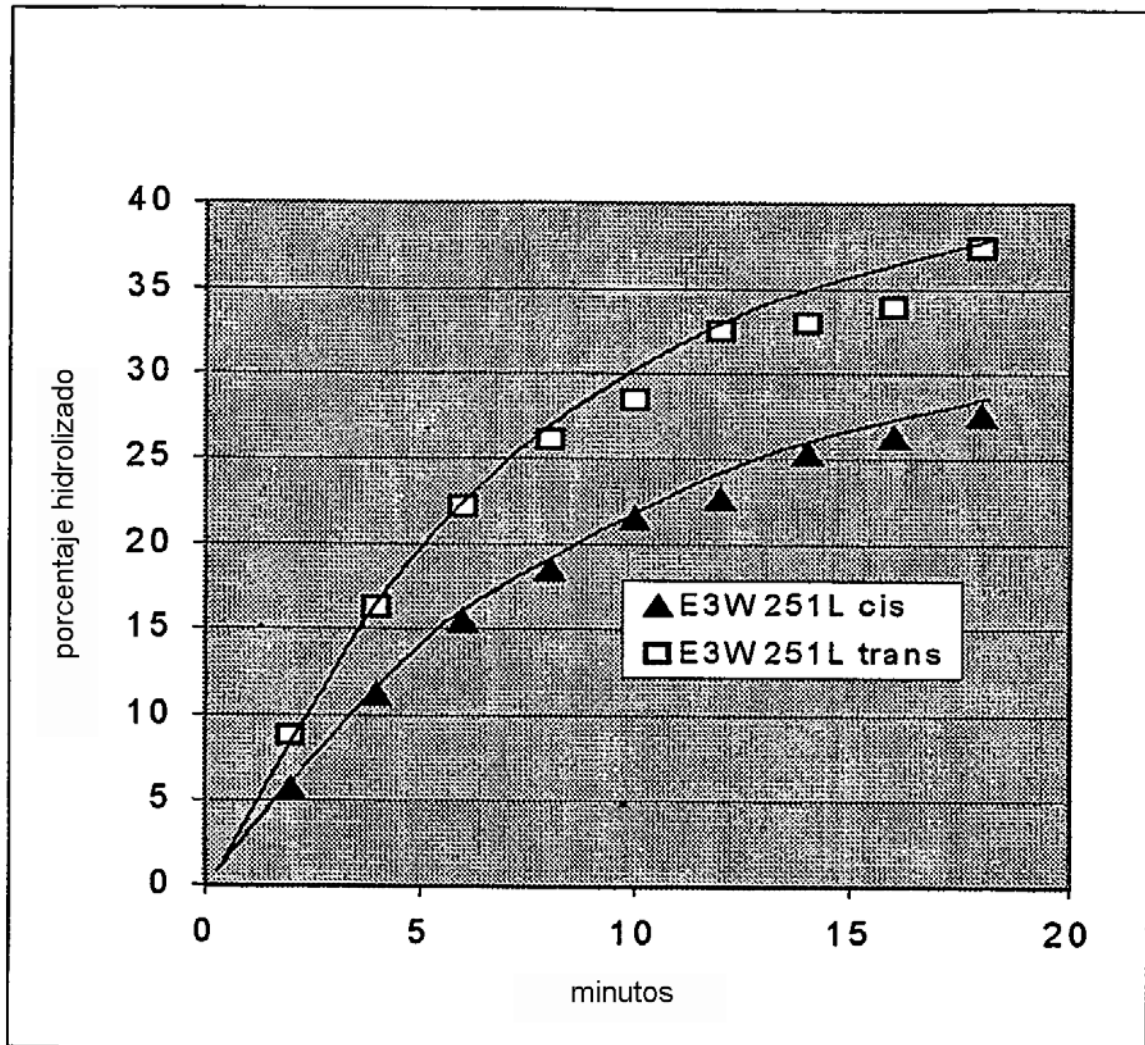


Figura 5