

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 188**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/55** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2001 E 01985372 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1343902**

54 Título: **Esterasas de hígado de cerdo recombinantes, su uso así como un procedimiento para su preparación**

30 Prioridad:

**12.12.2000 DE 10061864**

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

**29.08.2013**

73 Titular/es:

**ENZYMICALS AG (100.0%)  
Walther-Rathenau-Strasse 49a  
17489 Greifswald, DE**

72 Inventor/es:

**BORNSCHEUER, UWE;  
MUSIDLOWSKA, ANNA;  
SCHMIDT-DANNERT, CLAUDIA y  
LANGE, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

**ES 2 421 188 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

Esterasas de hígado de cerdo recombinantes, su uso así como un procedimiento para su preparación

5 La invención se refiere a las formas de realización descritas en las reivindicaciones.

Las lipasas y esterases pueden usarse como biocatalizadores eficaces para la representación de una pluralidad de compuestos ópticamente activos. Sin embargo, mientras que toda una serie de lipasas (en particular de origen microbiano) se obtienen comercialmente, existen sólo muy pocas esterases que estén a disposición para su uso en una división de racematos o asimetrización.

Aunque pudo mostrarse que con extractos de esterasa de tejido de hígado de cerdo pueden convertirse parcialmente sustratos con suficiente estereoselectividad, el uso de tales extractos está unido a una serie de inconvenientes. Además de las fluctuaciones de la proporción de esterases entre distintas cargas, en particular la presencia de otras hidrolasas puede considerarse como problemática con respecto a las estereoselectividades (Seebach, D. *et. al.*, *Chimia* (1986), 40, 315-318). Adicionalmente existe el problema de que los extractos convencionales se encuentran en forma de varias isoenzimas (Farb, D., *et. al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* (1980) 203, 214-226) que se diferencian parcialmente en su especificidad a sustrato de manera considerable. Heymann, E. y Junge, W. (*Eur. J. Biochem.* (1979), 95, 509-518; *Eur. J. Biochem.* (1979), 95, 519-525) lograron una separación electroforética costosa, de modo que pudieron aislarse fracciones que dividían preferentemente butirilcolina, prolin- $\beta$ -naftilamida y butirato de metilo. A diferencia de esto, otros estudios (por ejemplo B. Lam, L.K.P., *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1988) 110, 4409-4411) muestran únicamente diferencias en la actividad, pero no en la especificidad de fracciones individuales.

25 Por este motivo existe una necesidad de esterases de hígado de cerdo preparadas de manera biotecnológica con composición específica.

Si bien se ha logrado ya con éxito la clonación de supuestos genes de esterasa de hígado de cerdo (Takahashi, T, *et. al.*, *J. Biol. Chem.* (1989), 264, 11565-11571; *FEBS Lett.* (1991), 280, 297-300; *FEBS Lett.* (1991), 293, 37-41; Ldavid, L., *et. al.*, *Eur. J. Biochem.* (1998) 257, 142-148), sin embargo la expresión funcional de una enzima activa de esterasa de hígado de cerdo no se ha logrado con éxito hasta ahora, a pesar de la demanda existente de tales enzimas.

35 Por consiguiente era objetivo de la presente invención proporcionar una esterasa de hígado de cerdo enzimáticamente activa, que pueda prepararse fácilmente de manera biotecnológica.

El objetivo se solucionó mediante esterases de hígado de cerdo cuyas subunidades monoméricas están truncadas en el extremo C terminal en comparación con las subunidades de esterases de hígado de cerdo que se producen en la naturaleza. Además ha resultado adicionalmente ventajoso truncar igualmente el extremo N terminal.

40 Pudo mostrarse sorprendentemente que la expresión biotecnológica con secreción de estas subunidades de la esterasa de hígado de cerdo en el medio conduce a esterases de hígado de cerdo recombinantes enzimáticamente activas que pueden aislarse en gran parte sin impurezas, que actúan de manera altamente enantioselectiva y basándose en esto garantizan resultados reproducibles en la conversión de sustratos, en particular con respecto al rendimiento y enantioselectividad.

45 Por consiguiente son un objeto de la presente invención subunidades recombinantes de las esterases de hígado de cerdo, a las que les falta en el extremo C terminal de 3 a 10 aminoácidos y de manera especialmente preferente 3 ó 4 aminoácidos, en comparación con las esterases de hígado de cerdo que se producen en la naturaleza. Las subunidades de acuerdo con la invención pueden contener en el extremo C terminal otros dominios peptídicos funcionales, así por ejemplo etiquetas myc y/o etiquetas de poli-His para el aislamiento más fácil a través de cromatografía de afinidad.

50 Adicionalmente es ventajoso para la preparación funcional biotecnológica eliminar una región de 10 a 50 aminoácidos, preferentemente de 15 a 25 aminoácidos, en el extremo N terminal en comparación con los productos génicos que se producen en la naturaleza.

60 El extremo N terminal puede contener igualmente dominios peptídicos funcionales, a este respecto interesan en particular dominios señal de secreción, tales como la secuencia señal del factor  $\alpha$ , que está contenida por ejemplo en la secuencia de cebador correspondiente PLE-7F (**SEQ ID No. 8**), o la secuencia señal ompA, que está contenida por ejemplo en la secuencia de cebador PLE-9F (**SEQ ID No. 10**).

65 En particular se prefieren subunidades de esterases de hígado de cerdo que pueden obtenerse partiendo de una supuesta subunidad de esterases de hígado de cerdo de acuerdo con Swiss-Prot Acc. N.º Q29550, en este caso sobre todo una subunidad de esterases de hígado de cerdo con la secuencia de aminoácidos **SEQ ID No. 1**, sus formas mutantes funcionales con una homología de secuencia superior al 80%, en particular superior al 90%, que

pueden generarse también de manera biotécnica.

GQPASPPVVD TAQGRVLGKY VSLEGLAQPV AVFLGVPFAK PPLGSLRFAP  
 PQPAEPWSFV KNTTSYPPMC CQDPVVEQMT SDLFTNGKER LTLEFSEDCL  
 YLNIYTPADL TRRGRLPVMV WIHGGGLVLG GAPMYDGVVL AAHENVVVVA  
 IQYRLGIWGF FSTGDEHSRG NWGHLDQVAA LHWVQENIAN FGGDPGSVTI  
 FGESAGGESV SVLVLSPLAK NLFHRAISES GVALTVALVR KDMKAAAKQI  
 AVLAGCKTTT SAVFVHCLRQ KSEDELLDLT LKMKFLTLDL HGDQRESHPF  
 LPTVVDGVLL PKMPEEILAE KDFNTVPYIV GINKQEFMWL LPTMMGFPLS  
 EGKLDQKTAT SLLWKSYPPIA NIPEELTPVA TDKYLGGTDD PVKKKDLFLD  
 LMGDVVFVGP SVTVARQHRD AGAPTYMYEF QYRPSFSSDK KPKTVIGDHG  
 DEIFSVMGFP LLKGDAPEEE VLSKTMKMF WANFARSGNP NGEGLPHWPM  
 YDQEEGYLQI GVNTQAAKRL KGEEVAFWND LLSKEAAKKP PKIK

**(SEQ ID No. 1)**

5 Por una forma mutante funcional ha de entenderse en el sentido de esta invención una subunidad de esterasas de hígado de cerdo que puede congregarse para dar esterasas de hígado de cerdo recombinantes enzimáticamente activas. En esto se encuentran también las subunidades que pueden derivarse de los monómeros que se encuentran en la naturaleza de las esterasas de hígado de cerdo del tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Preferentemente en esto se encuentran formas mutantes generadas sintéticamente que se modificaron en el entorno del centro activo de la  
 10 enzima resultante. Esto se refiere por ejemplo a mutaciones en el entorno de las posiciones Asp80, Ser186 e His431 de la subunidad monomérica de acuerdo con la **SEQ ID No. 1**. Debido a ello puede aumentar la actividad y selectividad enzimática de la esterasa de hígado de cerdo recombinante con respecto a un sustrato determinado. En el término de la subunidad de esterasas de hígado de cerdo se encuentran además aquellos derivados del producto de traducción original que resultan mediante modificación postraduccional del mismo.

15 Las subunidades monoméricas individuales de la esterasa de hígado de cerdo recombinante pueden multimerizarse en disolución para dar una enzima especialmente funcional. A este respecto pueden entrar en contacto también subunidades de un tipo distinto entre sí. Además muestran también los propios monómeros una actividad enzimática, cuando también por regla general es más débil que los multímeros.

20 Las esterasas de hígado de cerdo así obtenidas se caracterizan por una alta pureza. En particular pueden evitarse así las impurezas que se producen en extractos de esterasas de hígado de cerdo mediante isoenzimas y otras hidrolasas. Las esterasas de hígado de cerdo recombinantes muestran adicionalmente una enantioselectividad elevada, parcialmente incluso una enantioselectividad muy elevada, lo que hace interesante su uso en síntesis orgánica-enzimáticas. Es especialmente interesante también que las esterasas de hígado de cerdo recombinantes muestren a veces una estereopreferencia contraria en comparación con esterasas de hígado de cerdo que pueden obtenerse comercialmente. Las esterasas de hígado de cerdo recombinantes pueden prepararse además en una  
 25 calidad constante.

30 Otro objeto de la presente invención son ácidos nucleicos que codifican para las subunidades de esterasas de hígado de cerdo recombinantes de acuerdo con la invención o fragmentos de ADN que son complementarios a tales secuencias de ácido nucleico, que hibridan con estos ácidos nucleicos codificantes en condiciones rigurosas. Para ello pueden usarse condiciones de hibridación habituales (por ejemplo 60°C, 0,1 x SSC, 0,1% de SDS).

35 En otra forma de realización preferente se introduce para la finalización dirigida de la traducción un codón de terminación en el extremo 3' de la región codificante.

Las secuencias de ADN codificantes pueden clonarse en vectores convencionales y tras la transfección de células

huésped con tales vectores se expresan en cultivo celular. Un vector adecuado es por ejemplo el vector pUC19 o el vector pCYTEX para la transformación de *E. coli* o el vector pPICZ $\alpha$  para la transformación de la levadura *Pichia pastoris*. Dentro de las especies *Aspergillus sp.*, *Schwanniomyces sp.*, *Kluyveromyces sp.*, *Yarrowia sp.*, *Arxula sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenula sp.* o *Pichia sp.* se encuentran otros organismos unicelulares interesantes, que han resultado adecuados como huésped para la expresión biotecnológica de enzimas recombinantes. Como organismos huéspedes preferentes pueden nombrarse además de *P. pastoris* *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Arxula adeninivrans*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii*. o *Hansenula polymorpha*.

Los fragmentos de ADN codificantes deben encontrarse en los vectores en el marco de lectura abierto para un promotor. Como promotores se prefieren sobre todo promotores fuertes, tales como por ejemplo el promotor lac, lambda, T7, T4, el promotor inducible por ramnosa o el promotor de alcoholoxidasa (AOXI). Los vectores pueden contener otras regiones funcionales. Además de los marcadores de selección y los puntos de inicio de la replicación son interesantes sobre todo elementos reguladores del gen, tales como por ejemplo operadores, represores o factores de transcripción. En particular puede usarse una construcción de vectores que permita una expresión reversible, inducible o reprimible de las subunidades de esterasas de hígado de cerdo recombinantes o de la propia enzima funcional. Ciertas células huéspedes preferentes para la transfección con vectores, que contienen los fragmentos de ADN codificantes de acuerdo con la invención para la expresión de subunidades de esterasas de hígado de cerdo, son organismos unicelulares procariontes o eucariotes, tales como por ejemplo *Aspergillus sp.*, *S. cerevisiae*, *Hansenula sp.*, *E. coli* o *P. pastoris*.

Por consiguiente, otro objeto de la presente invención es el uso de fragmentos de ADN que codifican para una subunidad de esterasas de hígado de cerdo de acuerdo con la invención y eventualmente para otros dominios N y/o C terminales fusionados con la misma, para la clonación en vectores, el uso de estos vectores para la transformación de células así como el uso de tales células transformadas o cultivos celulares para la expresión de las subunidades de esterasas de hígado de cerdo recombinantes. Las subunidades expresadas pueden aislarse por ejemplo en forma monomérica, sin embargo también es posible la multimerización de las subunidades para obtener esterasas de hígado de cerdo recombinantes enzimáticamente activas en el medio y el aislamiento posterior de la enzima funcional.

Se prefiere el cultivo de las células huéspedes y la expresión secretora de las subunidades de esterasas de hígado de cerdo en recipientes de cultivo de líquidos en un procedimiento de estado estacionario.

La actividad de la esterasa expresada puede comprobarse fotométricamente mediante la conversión de sustratos seleccionados. A este respecto, ha resultado adecuada la división de cromóforos de acetatos catalizada por esterasa, tales como por ejemplo acetato de p-nitrofenilo.

Además de la expresión biotecnológica de esterasas de hígado de cerdo recombinantes enzimáticamente activas pueden usarse los fragmentos de ADN, los vectores de expresión o sistemas de expresión para la mutagénesis. Las esterasas de hígado de cerdo mutantes que pueden expresarse entonces y sus subunidades monoméricas pueden someterse a prueba y seleccionarse con respecto a su actividad enzimática. Mediante repetición múltiple del ciclo de mutagénesis, expresión y selección pueden generarse catalizadores enzimáticos apropiados para la síntesis orgánica. A este respecto, la etapa de selección puede realizarse mediante adición de las enzimas recombinantes expresadas a una mezcla de reacción que contiene un posible sustrato, pudiéndose determinar la reacción por ejemplo fotométricamente.

Como sustrato para la reacción catalítica por medio de esterasa de hígado de cerdo recombinante se tienen en cuenta sobre todo ésteres aromático-alifáticos y alifático-alifáticos, a este respecto sobre todo ésteres de ácido carboxílico de alcoholes quirales o proquirales, comprendiendo el componente ácido carboxílico preferentemente de 2 a 6, de manera especialmente preferente de 2 a 4 átomos de C y pudiéndose ramificar también. La división de racematos enzimáticamente catalítica de los ésteres de ácido carboxílico, en particular de los acetatos, discurre a este respecto con de alta a excelente enantioselectividad. El grado óptimo de la actividad enzimática de esterasas de hígado de cerdo recombinantes, que contienen subunidades monoméricas de acuerdo con la **SEQ ID No. 1**, se encuentra a un pH entre 5 y 10, preferentemente entre 7 y 9, y a una temperatura entre 20°C y 90°C, preferentemente entre 30°C y 80°C, de manera especialmente preferente entre 40°C o 50°C y 60°C o 70°C.

Adicionalmente pueden usarse las enzimas recombinantes de acuerdo con la invención también en la división de racematos de ácidos carboxílicos o en la conversión de compuestos prostereogénicos, en particular de dioles o ácidos dicarboxílicos.

A continuación se proporcionan para la aclaración de la invención algunos ejemplos de realización que sin embargo no han de interpretarse como limitativos.

Microorganismos, medios, vectores y oligonucleótidos usados generales

La cepa DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup> *endA1 hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>)supE44 rhi-I  $\lambda$ . gyrA96 relI Al  $\Delta$ (*argF-lacZya*)U169) de *E. coli* se usa para la*

obtención y la multiplicación de los siguientes plásmidos usados. La cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* se cultiva en LB<sub>bajo contenido salino</sub> (extracto de levadura 10 gl<sup>-1</sup>, peptona 1010 gl<sup>-1</sup> y NaCl 5 gl<sup>-1</sup>). La disolución de cultivo se mezcla con ácido nalidíxico 50 mg l<sup>-1</sup> y eventualmente con ampicilina 100 mg l<sup>-1</sup> o zeocina 25 mg l<sup>-1</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

- 5 Para el ensayo de expresión se usó la levadura *Pichia pastoris* X33 (Invitrogen). Para el cultivo de las células *Pichia* se usaron los siguientes medios:
- medio YPD (un 1% de extracto de levadura, un 2% de peptona y un 2% de glucosa);
  - medio YPDS (medio YPD en sorbitol 1 M);
- 10 - medio BMGY (un 1% de extracto de levadura, un 2% de peptona, fosfato de potasio 100 mM pH 6, un 1,34% de base nitrogenada de levadura con sulfato de amonio sin aminoácidos y un 1% de glicerol);
- medio BMMY (medio BMGY, usándose un 0,5% de metanol esterilizado por filtración en lugar de un 1% de glicerol)
- 15 Los medios se mezclan con zeocina 100 mg l<sup>-1</sup>. Para los medios que pueden colocarse en placa se añade un 1,5% de agar.

Se usó el vector de *E. coli* - *P. pastoris* pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen) para clonar una secuencia de ADN que codifica para una carboxilesterasa de hígado de cerdo, que se encuentra bajo el control del promotor de la alcoholoxidasa AOX1.

20 Los cebadores de oligonucleótidos usados para la PCR están agrupados en la tabla 1.

Tabla 1		
Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos	Observación
PLE-1F	5`-GAT ATC CCG GGC ATA TGT GGC (SEQ ID No. 2)	EcoRV, SmaI NdeI
PLE-2R	TTC TCC CGC TGG T-3` 5`-GCA TCC CGG GAA TTC TCA CAG	SmaI, EcoRI
PLE-3F	CTC AGC ATG CTT TA-3` 5`-GGG CAG CCA GCC TCG CCG CCT	-
PLE-4R	GTT GTG GAC A-3` 5`-TCA CAG CTC AGC ATG CTT TAT	-
LE-5F	CTT GGG TGG C-3` 5`-AGC CTG CGC TAC GGT AGC GAA AC-3`	-
PLE-6R	(SEQ ID No. 6) 5`-TGA AGG GAT CCT AAG TAA GTA G-3`	-
PLE-7F	(SEQ ID No. 7) 5`-AAG CTG AAT TCG GGC AGC CAG	EcoRI
PLE-8R	CCT CGC CGC CT-3` 5`-GTC AGT CTA GAT CAC AGC TCA	XbaI
PLE-9F	GCA TGC TTT ATC-3` 5`-AAG CTG AAT TCG GGC AGC CAG	EcoRI
PLE-10R	CCT CGC CGC CTG-3` 5`-ACC TCT AGA TAC TTT ATC TTG	XbaI
PLE-11R	GGT GGC TTC-3` 5`-ACC TCT AGA TCA CTT TAT CTT	XbaI
	GGG TGG CTT C-3` (SEQ ID No. 12)	

Generalidades: recombinación de ADN y transformación

- 25 Siempre que no se mencione lo contrario se usan procedimientos convencionales según Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbour, NY. Para la extracción de plásmido y ADN se usa un kit QIAprep Spin Miniprep, un kit Plasmid Midi o un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). Las enzimas de restricción usadas se usan de acuerdo con las respectivas indicaciones

del fabricante. La secuenciación de ADN se realiza por medio de dos cadenas con ayuda del kit de secuenciación Taq Ready Reaction Dye Deoxy<sup>TM</sup> Terminator Cycle (Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania). Los productos de secuenciación se analizan con un secuenciador de ADN 373 de la misma empresa. Para la preparación y transformación de células competentes de *E. coli* se usa un protocolo convencional de acuerdo con Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 2172-2175. La transformación de *P. pastoris* se realiza con los respectivos plásmidos mediante electroporación.

Ejemplo 1: preparación de tejido, aislamiento de ARNm y clonación de ADNc

10 Se homogeneizan 0,8 g de tejido de hígado de cerdo fresco y se aísla el poliA-ARNm liberado usando el kit Fast Track 2.0 (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones realizadas por el fabricante. La síntesis de ADNc a base del extracto de ARNm se realizó mediante RT-PCR con ayuda del kit cDNA Cycle<sup>TM</sup> (Invitrogen) usando cebadores oligo-dT de acuerdo con el protocolo del kit. Se ha recurrido a los productos de la RT-PCR entonces como molde para la amplificación de la esterasa de hígado de cerdo (*pig liver esterase* PLE). Como cebadores específicos de gen se usaron a este respecto los oligonucleótidos PLE-1F (**SEQ ID No. 2**) y PLE-2R (**SEQ ID No. 3**) (tabla 1), de manera que al mismo tiempo se introdujeron sitios de corte de restricción necesarios para la clonación del producto de PCR. Los dos cebadores se prepararon por medio de la secuencia de ARNm de la prolina-naftilamidasa de hígado de cerdo (Matsushima, M., *et. al.* (1991) FEBS Lett. 293, 37-41) de la que se esperaba que tuviera una secuencia complementaria a la PLE. La PCR se realizó en un termociclador (Robocycle Gradient 40, Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). Tras una primera etapa de desnaturalización de cinco minutos a 95°C se realizaron 28 ciclos de acuerdo con el siguiente programa de temperatura: 1 min 95°C, 2 min 55°C y 3 min 72°C. El producto de PCR purificado se clona con sus extremos enteros en el sitio de corte de restricción con *SmaI* del vector pUC19. El vector pUC19-PLE-R resultante se usó para la transformación de cepas DH5 $\alpha$  de *E. coli*, el plásmido se multiplicó mediante cultivo de las cepas transformadas. El plásmido se aisló de las cepas recombinantes de *E. coli*, se identificó a través de la determinación de tamaño o mapeo de restricción y se consultó como molde para la amplificación por PCR de la secuencia de la PLE. La secuencia de la PLE amplificada se secuenció a continuación.

Ejemplo 2: construcción de un vector de expresión para *E. coli* y para *P. pastoris*:

30 Para la expresión intracelular de la PLE clonada en *E. coli* se cortó el vector pUC19-PLE-R con *NdeI* y *EcoRI*, debido a ello se obtiene un fragmento de 1705 pb de longitud que codifica para la secuencia de la PLE completa que se produce en la naturaleza. El fragmento de restricción obtenido se inserta en los sitios de corte de restricción de *NdeI/EcoRI* de pT1-BTL2 (Belev, T.N. *et. al.* (1991) Plasmid, 26, 147-150), formándose un nuevo vector pCYTEX-PLE (6652 pb). Para la expresión periplasmática de secuencias de la PLE sin la secuencia líder N terminal (mPLE) se amplificó la secuencia de ADN correspondiente con los cebadores PLE-3F (**SEQ ID No. 4**) y PLE-4R (**SEQ ID No. 5**) (tabla 1) y se ligó con su extremo entero en la secuencia pT1-ompA del vector pT1-ompA-BTL2 (Rua, M.L., *et. al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, 405-410), que igualmente puede amplificarse con ayuda de los cebadores PLE-5F (**SEQ ID No. 6**) y PLE-6R (**SEQ ID No. 7**) (tabla 1). El vector resultante (que ya no contiene el gen BTL2) se designa como pCYTEX-ompA-mPLE (6682 pb), que contiene el gen mPLE en el marco de lectura abierto para la secuencia líder de ompA bajo el control de un promotor  $\lambda$  inducible mediante calentamiento. Para la expresión del gen mPLE en *P. pastoris* se clonó la secuencia de ADN de mPLE en el marco de lectura abierto detrás de una secuencia señal del factor  $\alpha$  del vector de *E. coli* - *P. pastoris* pPICZ $\alpha$ A (de Invitrogen). El gen mPLE se amplificó entonces con los cebadores PLE-7F (**SEQ ID No. 8**) y PLE-8R (**SEQ ID No. 9**) (tabla 1), el producto de amplificación se corta con las enzimas de restricción *NdeI* y *XbaI* y se liga en el sitio de corte de restricción correspondiente del vector pPICZ $\alpha$ A. El vector resultante se designa con pPICZ $\alpha$ -mPLE.

Adicionalmente se construyeron vectores de expresión, cuyo producto de expresión presenta una delección del tetrapéptido HAEL en el extremo C terminal. Para ello se amplificó el gen mPLE por medio de los cebadores PLE-9F (**SEQ ID No. 10**) y PLE-10R (**SEQ ID No. 11**) o PLE-11R (**SEQ ID No. 12**). Los dos productos de la PCR se ligaron en el sitio de corte de restricción de *EcoRI/XbaI* de pPICZ $\alpha$ A. Los fragmentos generados con ayuda del cebador PLE-10R conducen a una proteína de fusión que contiene dominios de etiqueta myc y etiqueta de His, que están ya codificados en el vector pPICZ $\alpha$ A original. El producto de la PCR que puede obtenerse mediante el uso del cebador PLE-11 no contiene ninguna etiqueta C terminal, dado que mediante el cebador se introduce un codón de terminación que impide la fusión con los dominios de etiqueta del vector pPICZ $\alpha$ A.

55 Todos los vectores resultantes pPICZ $\alpha$ -mPLE (5183 pb), pPICZ $\alpha$ -mPLE\*-1 (5170 pb) y pPICZ $\alpha$ -mPLE\*-2 (5171 pb) se linealizan en el sitio de corte de restricción de *PmeI* y se introducen en *P. pastoris* por medio de electroporación (Invitrogen). Los vectores preparados están reproducidos esquemáticamente en la **figura 1**.

60 Ejemplo 3: expresión de PLE recombinante en DH5 $\alpha$  de *E. coli*

Las DH5 $\alpha$  recombinantes de *E. coli*, que están transformadas con el vector pCYTEX-PLE o el vector PCYTEX-ompA-mPLE se cultivan a 37°C, 200 rpm en medio LB hasta que se obtiene una densidad celular de DO<sub>578</sub> de 0,8 a 1,0. La expresión de la proteína recombinante se indujo mediante aumento de la temperatura hasta 42°C. A cada hora se extrajo una muestra, de 3 a 4 horas tras la inducción se recogieron las células y se almacenaron a -20°C o

se sometieron a ensayo directamente por medio de SDS-PAGE o un ensayo de actividad.

Ejemplo 4: cultivo y expresión secretora de la PLE recombinante en *P. pastoris*

5 Los clones recombinantes, seleccionados en medio de cultivo con zeocina se recogieron y se cultivaron en medio YPDS a 30°C, 200 rpm hasta que se obtiene una densidad celular de DO<sub>600</sub> de aproximadamente 15. Se inocularon 25 ml de un medio BMGY con 200 µl de este cultivo y se cultivaron durante la noche a 30°C. Entonces se aislaron las células de levadura mediante centrifugación de cinco minutos a 3000 g y 4°C y se transfirieron a medio de inducción BMMY, cultivándose el cultivo hasta obtener una densidad celular de DO<sub>600</sub> de 1,0. La inducción se realiza mediante adición diaria de un 0,5% (v/v) de metano. Tras la inducción de 96 horas se recogieron las células mediante centrifugación. Los sobrenadantes contienen la enzima recombinante que se concentra mediante centrifugación de 15 minutos a 4000 g y 4°C con la adición de 20 ml de Centricon (NMWL 30000, Ultracel-PL membrane, Millipore). La determinación de la actividad durante la fase de crecimiento del cultivo y del medio concentrado que contiene enzima se determinó con un ensayo de pNPA, las proteínas se identificaron con ayuda de la electroforesis en gel (a continuación se realiza la descripción en más detalle). Como referencia para la determinación densitométrica de la concentración de proteínas se usó albúmina sérica en concentraciones conocidas.

Ejemplo 5: electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

20 Se mezclaron 20 µl de carboxilesterasa de hígado de cerdo que puede obtenerse comercialmente (100 U, según el ensayo de pNPA) disueltos en 2 ml o 20 µl del sobrenadante concentrado 10 veces del cultivo de *P. pastoris* con 10 µl de un tampón de muestra 2xSDS. Tras el calentamiento de la disolución a 95°C durante 5 min, se separan las proteínas en un gel de poliacrilamida al 12,5%, gel de carga al 4%. Las muestras se tiñeron para la detección de proteínas con azul brillante de Coomassie R250. Para la determinación de la actividad de la esterasa se renaturalizaron las proteínas durante 12 horas en una disolución de Triton X-100 (0,5% en Tris/HCl 0,1 M pH 7,5). Entonces se mezcló el gel con una mezcla 1:1 de disolución A (20 mg de acetato de α-naftilo disueltos en 5 ml de acetona y adición posterior de 50 ml de Tris/HCl 0,1 M pH 7,5, 50 mg de sal Fast Red TR disueltos en 50 ml de Tris/HCl 0,1 M, pH 7,5) y disolución B (50 mg de sal Fast Red TR disueltos en 50 ml de Tris/HCl 0,1 M, pH 7,5). En presencia de actividad hidrolítica de lipasa o esterasa se forma una forma roja de α-naftilo del Fast Red (Krebsfänger, N., et. al., (1998) Enzyme Microb. Technol. 22, 641-646).

Ejemplo 6: secuenciación de proteínas N terminal

35 La fracción de PLE que puede obtenerse comercialmente se separa y se somete a transferencia desde un gel SDS-PAGE en una membrana de PVDF (Matsudaira, P. (1987) J. Biol. Chem. 262, 10035-10038). La secuenciación se realiza con un secuenciador en fase gaseosa.

Ejemplo 7: determinación de la actividad de esterasa

40 La actividad de esterasa se determina fotométricamente en un tampón fosfato de sodio (50 mM, pH 7,5). Se usa acetato p-nitrofenilo (10 mM disuelto en DMSO) como sustrato. La cantidad liberada de p-nitrofenol se determina a 410 nm ( $\epsilon = 12,36 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) a temperatura ambiente. Se determinó adicionalmente la actividad enzimática a distintos valores de pH. Como unidad U se define una actividad de esterasa, en la que se hace reaccionar 1 µmol de p-nitrofenol por minuto en condiciones de ensayo. Se determinó la especificidad de sustrato de PLE usando un ensayo de pH-stat. Para ello se añadieron a 30 ml de una emulsión que contenía un 5% (v/v) de un éster (butirato de metilo, caprilato de etilo, acetato de etilo, trioleína, tricaprilina) y un 2% (p/v) de goma arábiga. Para ello se añade a una temperatura de 37°C, una cantidad definida de esterasa. El ácido liberado se titula automáticamente con ayuda de un ensayo de pH-stat (Schott, Mainz, Alemania) con NaOH 0,01 N para mantener un valor de pH constante de 7,5. Una U corresponde a un consumo de ácido de 1 µmol por minuto en condiciones de ensayo. La determinación de la actividad a distintas temperaturas se realizó con caprilato de etilo como sustrato a pH 7,5. La actividad determinada máxima se acepta como valor al 100%.

Ejemplo 8: determinación de la actividad de prolina-β-naftilamidasa

55 La actividad de prolina-β-naftilamidasa se determina fotométricamente usando prolina-β-naftilamida (0,2 mM en DMSO) como sustrato. La reacción se realiza en una mezcla que contiene tampón Tris/HCl 0,1 M pH 8,0, 50 µl de sustrato y se mezcla con preparaciones de PLE recombinantes o que pueden obtenerse comercialmente a 37°C durante 30 min con 0,4 U (de acuerdo con el ensayo de pNPA). La reacción se interrumpe mediante adición de 1,5 ml de reactivo de acoplamiento FastGarnet (Sigma) (Barret, A.J., (1977) Proteinases in Mammalian Cells and Tissues Barret, A.J., ed págs. 181-208, Elsevier, Amsterdam). La cantidad liberada de β-naftilamina se determina a 520 nm ( $\epsilon = 24,03 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Una actividad amidasa U se define como la cantidad de enzima que libera 11 µmol de β-naftilamina por minuto en condiciones de ensayo.

65 Los productos de expresión de PLE de los vectores pCYTEX-PLE que contiene PLE con la secuencia líder nativa y pCYTEX-PLE-ompA-mPLE que contiene la secuencia de ácido nucleico de mPLE fusionada con la secuencia líder

de ompA, que debería garantizar una secreción de la enzima esterasa en el espacio periplasmático (la **figura 1**, 2) y 3) (Beer, H.D., *et. al.*, Biochim. Biophys. Acta. 1399, 173-180) muestran esquemáticamente los constructos de vector). Ninguno de los cultivos transfectados pudieron expresar, sin embargo, esterasa de hígado de cerdo nativa o recombinante enzimáticamente activa, tanto el ensayo con el SDS-PAGE como el ensayo de la actividad de esterasa fueron negativos.

Para la expresión de esterases de hígado de cerdo recombinantes en *P. pastoris* se recurre a vectores de acuerdo con la representación esquemática en la **figura 1**, 4) a 6). El vector representado en la **figura 1**, 5) (pPICZ $\alpha$ -mPLE\*-1) contiene además de la señal de secreción N terminal alfa (factor  $\alpha$ ), las etiquetas C terminales myc e His (6x), que proceden las dos del vector pPICZ $\alpha$ A. El constructo 6) (pPICZ $\alpha$ -mPLE\*-2) representado en la **figura 1** no contiene etiquetas C terminales, dado que en este caso se introdujo en el marco de lectura un codón de terminación delante de las regiones de vector correspondientes. En los constructos de vector falta en el extremo C terminal el extremo C terminal de HAEL que se produce en la esterasa de hígado de cerdo nativa. El tercer vector de *P. pastoris* preparado (pPICZ $\alpha$ -mPLE, **figura 1**, 4)) tiene adicionalmente en el extremo C terminal la secuencia tetrapeptídica natural HAEL (ER). Los vectores se linealizaron y con los mismos se transfectó *P. pastoris*. Los sobrenadantes de 30 clones se sometieron a ensayo respectivamente con respecto a la expresión activa de la enzima clonada con ayuda del ensayo de pNPA. En el caso del vector, **figura 1**, 4) no pudo establecerse ninguna actividad de esterasa. A diferencia de esto pudo mostrarse que mediante el uso de vectores de acuerdo con la **figura 1**, 5) o 6), a los que le faltan la región codificante para el extremo C terminal nativo, pueden expresarse y secretarse de manera activa. Se seleccionó cada clon con y sin etiquetas C terminales y se caracterizó posteriormente.

Se determinó la actividad de los sobrenadantes usados para otros ensayos tras el cultivo de 96 horas de los clones seleccionados con ayuda del ensayo de pNPA en 0,5 U/ml. Tras la concentración de la enzima mediante centrifugación resultó una actividad de 10 U/ml, lo que corresponde a una actividad de proteína específica de aproximadamente 500 U/mg. El cociente  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  se encuentra en caso de la esterasa de hígado de cerdo recombinante de acuerdo con la invención en  $139 \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  para pNPA como sustrato (en la siguiente tabla 2 se enumeran valores en comparación con un extracto de esterasa de hígado de cerdo que puede comprarse).

Tabla 2:

Esterasa	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$V_{m\acute{a}x}/K_m$ (min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
PLE recombinante	$0,74 \times 10^3$	5,32	139
Extracto de PLE que puede comprarse (Fluka)	$1,58 \times 10^3$	1,82	868

La PLE de acuerdo con la invención divide caprilato de etilo y tributirina con una actividad de aproximadamente 50 U/mg y acetato de etilo con una actividad de aproximadamente 20 U/mg. La trioleína no se divide, porque ésta exige una esterasa pura. Por el contrario, los extractos que pueden comprarse (Fluka o Roche (quirazima E-2)) hidrolizan trioleína, lo que indica la existencia de impurezas mediante lipasas o mediante isoenzima de PLE.

La **figura 2** muestra un análisis de SDS-PAGE (izquierda) y una detección de la actividad (derecha). El peso molecular de la subunidad de esterases recombinante de hígado de cerdo de acuerdo con la invención (**SEQ ID No. 1** con etiquetas C terminales, carriles 1 y 2 en la **figura 2**, Pm patrón de peso molecular) se encuentra en aproximadamente de 61 a 62 kDa, determinado con un análisis de SDS-PAGE. El análisis de la actividad con Fast Red muestra para la esterasa de hígado de cerdo recombinante de acuerdo con la invención (0,4 U) una banda nítida, mientras que los extractos que pueden comprarse están emborronados, lo que puede atribuirse a la existencia de distintas isoenzimas u otras hidrolasas (4 U PLE-Fluka, carril 3, 4 U PLE-quirazima-E2, carril 4, **figura 2**).

La medición de la actividad enzimática a distintas temperaturas y distintos valores de pH con respecto a la hidrólisis de caprilato de etilo muestra un grado óptimo a 60°C (pH 7,5), inactivándose completamente la esterasa de acuerdo con la invención a 70°C, y un grado óptimo a aproximadamente pH 8 (37°C).

La **figura 3** muestra la actividad relativa de la PLE recombinante de acuerdo con la invención (rPLE) y de los extractos de PLE que pueden comprarse (PLE-Fluka, quirazima E2) con respecto a los sustratos éster etílico del ácido caprílico, éster etílico del ácido acético, tributirina y triolina.

La **figura 4** muestra las actividades relativas de la enzima para los sustratos prolina- $\beta$ -naftilamida (PNA, barras negras) y butirato de metilo (barras blancas).

Ejemplo 9: caracterización adicional de la esterasa de hígado de cerdo recombinante obtenida

Electroforesis en gel de poliacrilamida nativa. Se mezclaron 10  $\mu$ l de PLE que puede obtenerse comercialmente (0,1 U) y 5-1  $\mu$ l de los sobrenadantes concentrados de los cultivos de *P. pastoris* con 10  $\mu$ l de un tampón de muestra. Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida al 7,5%, gel de carga al 4%. Los geles se tiñeron para determinar la actividad y después con azul brillante de Coomassie.

La figura 5 muestra los resultados de la PAGE nativa de PLE recombinantes y comerciales. Pm: patrón de peso molecular: (272 kDa, ureasa Jack Bean (trímero); 132 kDa (dímero) y 66 kDa (monómero), albúmina sérica bovina; 45 kDa, albúmina de huevo de pollo); carril 1: 0,1 U de Fluka PLE; carril 2: 0,07 U de quirazima E-2; carriles 3-6: 0,1, 0,045, 0,09 y 0,045 U de rPLE (muestras de distintos cultivos), las unidades se basan en un ensayo de pNPA.

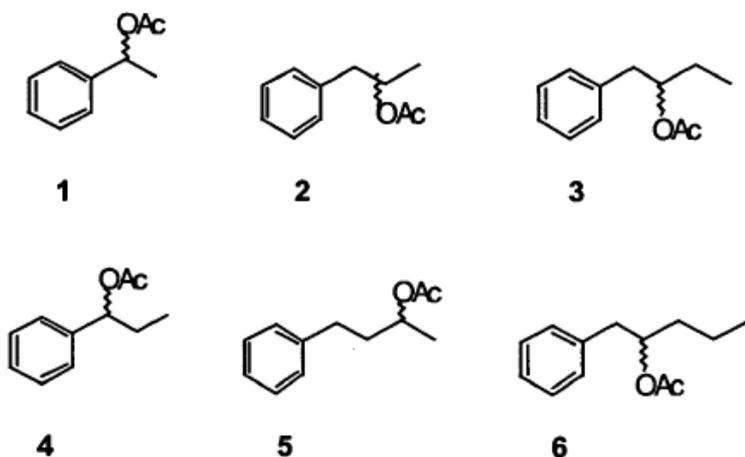
Focalización isoelectrica. Se mezclaron 1-5  $\mu$ l de los sobrenadantes concentrados de los cultivos *P. pastoris* (0,02 - 0,1 U) con 10  $\mu$ l de un tampón de prueba. Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida al 5% que contenía vehículo anfótero (2,4%; pH 3-10; Serva). Los geles se tiñeron para determinar la actividad, se fijaron con disolución de ácido tricloroacético (10% (p/v) durante 10 min, entonces 1% (p/v) durante la noche) y a continuación se tiñeron con azul brillante de Coomassie. El punto isoelectrico de la PLE recombinante asciende a pI: 4,78

Ejemplo 10: división de racematos de acetatos catalizada por esterasa

Para la hidrólisis catalizada por esterasa se disolvieron 10 mMol de un acetato en tampón fosfato de sodio (pH 7,5, 50 mMol) y se añadieron a un recipiente de reacción de 1 ml y se inició la división de racematos mediante adición de 0,5 unidades (con respecto a la prueba de pNPA) de esterasa. Para la interrupción de la reacción se extrajo la mezcla con cloruro de metileno y se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio libre de agua. La determinación de la pureza enantiomérica y de la conversión se realizó mediante cromatografía de gas (columna: heptakis(2,6-O-metil-3-O-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina, gas portador: H<sub>2</sub>, detector de ionización de llama).

Se convirtieron enzimáticamente los siguientes sustratos de acetato:

Acetato de 1-fenil-1-etilo **1**, acetato de 1-fenil-2-propilo **2**, acetato de 1-fenil-2-butilo **3**, acetato de 1-fenil-1-propilo **4**, acetato de 1-fenil-3-propilo **5**, acetato de 1-fenil-2-pentilo **6**



Los productos (alcoholes) de la división de racematos cinética con esterasas de hígado de cerdo se designan correspondientemente con **1a-6a**.

Tiempos retención: **1** (isoterma a 100°C) : (S)-**1** 3,7 min; (R)-**1**, 5,8 min; (R)-**1a** 6,7 min; (S)-**1a**, 7,6 min; **2** (isoterma a 75°C): (S)-**2** 26,5 min; (R)-**2**, 42,3 min; (S)-**2a** 32,6 min; (R)-**2a**, 34,2 min. **3** (isoterma a 90°C): (S)-**3** 17,6 min; (R)-**3**, 20,2 min; (S)-**3a** 24,8 min; (R)-**3a**, 27,4 min. **4** (isoterma a 80°C): (S)-**4** 13,9 min; (R)-**4** 20,9 min; (S)-**4a** 51,5 min; (R)-**4a** 44,6 min. **5** (isoterma a 100°C): (S)-**5** 15,6 min; (R)-**5** 28,7 min; (S)-**5a** 19,1 min; (R)-**5a**, 20,5 min. **6** (90°C/ 30'// 5°C/min// 110°C): (S)-**6**: 29,1 min y (R)-**6** 30,4 min; (S)-**6a** 37,3 min y (R)-**6a** 38,3 min.

Determinación de la configuración absoluta:

La configuración absoluta se basa para **1** en una comparación con (R)-**1** que puede adquirirse. En **2**, **3** y **4** sirvió la preferencia (R) conocida en la bibliografía de la lipasa Amano PS como referencia (Gutman, A.L., *et al.*, *Tetrahedron: Asymmetry* (1993) 4, 839-844).

La configuración absoluta se basa para **5** en la preferencia conocida en la bibliografía de la lipasa comercial: lipasa Amano AK, preferencia R (K. Burgess, LD Jennings, *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 6129) para 1-fenil-3-butanol (**5a**). La configuración absoluta para **6** se basa en la medición del valor de giro del alcohol ópticamente puro y la comparación con los datos de la bibliografía (U. P. Dhokte, P. M. Pathare, V. K. Mahindroo, H. C. Brown, *J. Org. Chem.* 1998, 63, 8276-8283).

La enantioselectividad E puede calcularse de acuerdo con Chen, C. S. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982), 7294.

Los resultados están resumidos en las tablas 3 a 8.

Tabla 3: Enantioselectividad de distintas esterasas de hígado de cerdo en la división de racematos cinética de acetato de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etilo **1**

Fuente de PLE <sup>(a)</sup>	Tiempo (hora)	Exceso enantiomérico (%ee <sub>S</sub> )	Exceso enantiomérico (%ee <sub>R</sub> )	Conversión (%)	E <sup>(b)</sup>
Recombinante	1	58 ( <i>S</i> )	53 ( <i>R</i> )	53	5,7
Fluka	1,5	65 ( <i>S</i> )	56 ( <i>R</i> )	54	6,8
Sigma	1	72 ( <i>S</i> )	58 ( <i>R</i> )	55	7,8
Quirazima E-1	5	73 ( <i>S</i> )	58 ( <i>R</i> )	56	7,9
Quirazima E-2	1	61 ( <i>S</i> )	56 ( <i>R</i> )	52	6,5

<sup>(a)</sup> en todas las reacciones se usaron 0,5 unidades (con respecto a la prueba de pNPA).

<sup>(b)</sup> la enantioselectividad E se calculó de acuerdo con Chen *et al.* (1982).

5

Tabla 4: Enantioselectividad de distintas esterasas de hígado de cerdo en la división de racematos cinética de acetato de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propilo **2**

Fuente de PLE <sup>(a)</sup>	Tiempo (hora)	Exceso enantiomérico (%ee <sub>S</sub> )	Exceso enantiomérico (%ee <sub>R</sub> )	Conversión (%)	E <sup>(b)</sup>
Recombinante	2	75 ( <i>R</i> )	70 ( <i>S</i> )	52	12,6
Fluka	1,5	35 ( <i>S</i> )	44 ( <i>R</i> )	44	3,6
Sigma	1,5	24 ( <i>S</i> )	32 ( <i>R</i> )	43	2,4
Quirazima E-1	1,5	22 ( <i>S</i> )	43 ( <i>R</i> )	34	3,1
Quirazima E-2	1	9 ( <i>S</i> )	9 ( <i>R</i> )	50	1,3

<sup>(a)</sup>, <sup>(b)</sup> véase la tabla 3

10

Tabla 5: Enantioselectividad de distintas esterasas de hígado de cerdo en la división de racematos cinética de acetato de (*R*, *S*)-1-fenil-2-butilo **3**

Fuente de PLE <sup>(a)</sup>	Tiempo (hora)	Exceso enantiomérico (%ee <sub>S</sub> )	Exceso enantiomérico (%ee <sub>R</sub> )	Conversión (%)	E <sup>(b)</sup>
Recombinante	2	57 ( <i>R</i> )	>99 ( <i>S</i> )	36	>>100
Fluka	2	12 ( <i>R</i> )	12 ( <i>S</i> )	49	1,4
Sigma	1	17 ( <i>R</i> )	11 ( <i>S</i> )	59	1,5
Quirazima E-1	2	19 ( <i>R</i> )	18 ( <i>S</i> )	52	1,7
Quirazima E-2	1	58 ( <i>R</i> )	40 ( <i>S</i> )	59	4

<sup>(a)</sup>, <sup>(b)</sup> véase la tabla 3

Tabla 6: Enantioselectividad de distintas esterasas de hígado de cerdo en la división de racematos cinética de acetato de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propilo **4**

PLE <sup>(a)</sup>	Tiempo [hora]	Exceso enantiomérico [%ee <sub>S</sub> ] <sup>(c)</sup>	Exceso enantiomérico [%ee <sub>R</sub> ] <sup>(c)</sup>	Conversión (%)	E <sup>(b)</sup>
Recombinante	4	13	20	40	1,7
Fluka	1	21	28	43	2,2
Sigma	0,5	17	19	48	1,7
Quirazima E-1	0,5	9	13	41	1,4
Quirazima E-2	0,5	18	27	40	2,1

<sup>(a)</sup>, <sup>(b)</sup> véase la tabla 3

<sup>(c)</sup> en todos los casos el alcohol de producto **4a** tenía configuración (*R*) y el acetato que no había reaccionado **4** tenía configuración (*S*)

15

Tabla 7: Enantioselectividad de distintas esterasas de hígado de cerdo en la división de racematos cinética de acetato de (R, S)-4-fenil-2-butilo **5**

PLE <sup>[a]</sup>	Tiempo (hora)	Exceso enantiomérico (%ees)	Exceso enantiomérico (%ee <sub>R</sub> )	Conversión (%)	E <sup>[b]</sup>
Recombinante	2	52 (R)	59 (S)	47	6,3
Fluka	0,5	31 (S)	42 (R)	42	3,2
Sigma	0,25	22 (S)	25 (R)	47	2,1
Quirazima E-1	0,5	25 (S)	29 (R)	47	2,3
Quirazima E-2	1	1 (R)	2 (S)	43	1,1

<sup>[a]</sup>, <sup>[b]</sup> véase la tabla 3

Tabla 8: Enantioselectividad de distintas esterasas de hígado de cerdo en la división de racematos cinética de acetato de (R, S)-1-fenil-2-pentilo **6**.

PLE <sup>[a]</sup>	Tiempo [hora]	Exceso enantiomérico [%ees] <sup>[c]</sup>	Exceso enantiomérico [%ee <sub>R</sub> ] <sup>[c]</sup>	Conversión (%)	E <sup>[b]</sup>
Recombinante	2	69	78	47	16,7
Fluka	0,3	24	26	48	2,1
Sigma	0,5	15	13	52	1,5
Quirazima E-1	0,5	9	11	46	1,3
Quirazima E-2	0,3	21	24	46	2,0

<sup>[a]</sup>, <sup>[b]</sup> véase la tabla 1.

<sup>[c]</sup> en todos los casos el alcohol de producto **6a** tenía configuración (S) y el acetato que no había reaccionado **6** tenía configuración (R)

El ejemplo muestra que la esterasa de hígado de cerdo recombinante usada muestra enantioselectividad superior en comparación con extractos enzimáticos. Esto se manifiesta en particular en acetatos de fenil-alquilo que están esterificados en la posición 2 ó 3.

Ejemplo 11: preparación de los sustratos de enzima

Los sustratos pueden sintetizarse según procedimientos convencionales químicos. A continuación se describe la síntesis de sustratos (**2**) - (**6**) y del precursor (**6a**). Todos los otros sustratos pueden obtenerse comercialmente.

Se disuelven 40 mmol de cloruro de ácido acético en 20 ml de piridina a 4°C. A continuación se añaden gota a gota con agitación fuerte 40 mMol del alcohol (1-fenil-2-propanol **2a**, 1-fenil-2-butanol **3a**, 1-fenil-1-propanol **4a**, 1-fenil-3-propanol **5a**, 1-fenil-2-pentanol **6a**) y se mezclan durante 20 horas a temperatura ambiente. Después se mezcla la mezcla de reacción con dietiléter y se lava dos veces con disolución saturada de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio libre de agua y se elimina el disolvente en el rotavapor. El acetato se aísla a continuación mediante cromatografía en gel de sílice (hexano:acetato de etilo, 5:1) en un rendimiento del 91% (**2**), 74% (**3**), 43% (**4**) o del 87% (**5**). El acetato (**6**) se aisló mediante cromatografía en columna con hexano:acetato de etilo 3:1 en un rendimiento del 25% (**6**).

Síntesis de (R,S)-1-fenil-2-pentanol (**6a**)

En la solución de reactivo de Grignard de 80 mmol de cloruro de propilmagnesio (16 ml de disolución etérica) se añade gota a gota con agitación 100 mmol de fenilacetaldehído en igual volumen de éter absoluto. Tras finalizar la adición se calienta la mezcla de reacción durante 2 horas con agitación en el baño de agua y después se enfría. Se añade hielo triturado y a continuación se añade tanto ácido clorhídrico semiconcentrado que se disuelve el precipitado generado. La capa etérica se separa y la fase acuosa se extrae aún dos veces con éter. Los extractos combinados se lavan con disolución saturada de hidrogenosulfito de sodio, disolución de hidrogenocarbonato y poca agua. Tras secar sobre sulfato de sodio libre de agua se elimina el éter por destilación y se fracciona el residuo mediante destilación. El producto se aisló en un rendimiento del 48%.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Degussa AG

<120> Esterasas de hígado de cerdo recombinantes, su uso así como un procedimiento para su preparación

<130> 200at29.wo

<140>  
<141>

5 <150> DE 100 61 864.2  
<151> 12-12-2000

<160> 12

10 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 544  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: subunidad de enzima recombinante

20 <400> 1

```

Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg Val
  1                5                10                15
Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala Val
                20                25                30
Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg Phe
                35                40                45
Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr Thr
  50                55                60
Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val Val Glu Gln Met Thr
  65                70                75                80
Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu Thr Leu Glu Phe Ser
                85                90                95
Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr Arg
    
```

ES 2 421 188 T3

			100					105				110			
Arg	Gly	Arg	Leu	Pro	Val	Met	Val	Trp	Ile	His	Gly	Gly	Gly	Leu	Val
			115					120				125			
Leu	Gly	Gly	Ala	Pro	Met	Tyr	Asp	Gly	Val	Val	Leu	Ala	Ala	His	Glu
			130				135				140				
Asn	Val	Val	Val	Val	Ala	Ile	Gln	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ile	Trp	Gly	Phe
145					150					155					160
Phe	Ser	Thr	Gly	Asp	Glu	His	Ser	Arg	Gly	Asn	Trp	Gly	His	Leu	Asp
				165						170				175	
Gln	Val	Ala	Ala	Leu	His	Trp	Val	Gln	Glu	Asn	Ile	Ala	Asn	Phe	Gly
				180				185					190		
Gly	Asp	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Ile	Phe	Gly	Glu	Ser	Ala	Gly	Gly	Glu
				195				200				205			
Ser	Val	Ser	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Pro	Leu	Ala	Lys	Asn	Leu	Phe	His
				210			215					220			
Arg	Ala	Ile	Ser	Glu	Ser	Gly	Val	Ala	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	Val	Arg
225					230						235				240
Lys	Asp	Met	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Gln	Ile	Ala	Val	Leu	Ala	Gly	Cys
				245						250				255	
Lys	Thr	Thr	Thr	Ser	Ala	Val	Phe	Val	His	Cys	Leu	Arg	Gln	Lys	Ser
				260				265					270		
Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Asp	Leu	Thr	Leu	Lys	Met	Lys	Phe	Leu	Thr	Leu
				275				280				285			
Asp	Phe	His	Gly	Asp	Gln	Arg	Glu	Ser	His	Pro	Phe	Leu	Pro	Thr	Val
				290			295				300				
Val	Asp	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Lys	Met	Pro	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Glu
305					310					315					320
Lys	Asp	Phe	Asn	Thr	Val	Pro	Tyr	Ile	Val	Gly	Ile	Asn	Lys	Gln	Glu
				325						330				335	
Phe	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro	Thr	Met	Met	Gly	Phe	Pro	Leu	Ser	Glu	Gly
				340					345				350		
Lys	Leu	Asp	Gln	Lys	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Trp	Lys	Ser	Tyr	Pro



<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador  
 <400> 3  
 gcatccccggg aattctcaca gctcagcatg ctta 35  
 5  
 <210> 4  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador  
 <400> 4  
 gggcagccag cctcgccgcc tgtgtggac a 31  
 15  
 <210> 5  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador  
 <400> 5  
 tcacagctca gcatgctta tctgggtgg c 31  
 25  
 <210> 6  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador  
 <400> 6  
 agcctgcgct acggtagcga aac 23  
 35  
 <210> 7  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador  
 <400> 7  
 tgaagggatc ctaagtaagt ag 22  
 45  
 <210> 8  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador  
 <400> 8  
 aagctgaatt cgggcagcca gcctcgccgc ct 32  
 55  
 <210> 9  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 9  
 gtcagtctag atcacagctc agcatgcttt atc 33

5  
 <210> 10  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 10  
 aagctgaatt cgggcagcca gcctcgccgc ctg 33

15  
 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

25  
 <400> 11  
 acctctagat actttatctt gggggcttc 30

30  
 <210> 12  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 12  
 acctctagat cactttatct tgggtggctt c 31

## REIVINDICACIONES

1. Subunidad recombinante de esterasas de hígado de cerdo, **caracterizada porque** la subunidad recombinante representa una forma truncada de una proteína con la secuencia MWLLPLVLTS LASSATWAGQ PASPPWDTA  
 5 QGRVLGKYVS LEGLAQPVAV FLGVVFAKPP LGSLRFAPPQ PAEPWSFVKN TTSYPPMCCQ DPVVEQMTSD  
 LFTNGKERLT LEFSEDCLYL NIYTPADLTK RGRLPVMVWI HGGGLVLGGA PMYDGLWAA HENVVVVAIQ  
 YRLGIWGGFFS TGDEHSRGNW GHLDQVAALH WVQENIANFG GDPGSVTIFG ESAGGESVSV LVLSPLAKNL  
 FHRAISESGV ALTVALVRKD MKAAAKQIAV LAGCKTTTSA VVHCLRQKS EDELLDLTLK MKFLTLDLDFHG  
 10 DQRESHPFLP TVVDGVLLPK MPEEILAEKD FNTVPYIVGI NKQEFGWLLP TMMGFPLSEG KLDQKTATSL  
 LWKSYPIANI PEELTPVATD KYLGGTDDPV KKKDLFLDLM GDWFGVPSV TVARQHRDAG APTYMYEFQY  
 RPSFSSDKKP KTVIGDHGDE IFSVFGFPL KGDAPPEEVS LSKTVMKFWA NFARSGNPNG EGLPHWPMYD  
 QEEGYLQIGV NTQAAKRLKG EEVAFWNDLL SKEAAKPPK IKHAEL, que está truncada en el extremo C terminal  
 en de 3 a 10 aminoácidos, o representa una forma mutante funcional de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No. 1  
 con una homología de secuencia superior al 80% con respecto a la misma.
- 15 2. Subunidad recombinante de esterasas de hígado de cerdo según la reivindicación 1, en la que la subunidad recombinante representa una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO. 1.
3. Subunidad recombinante de una esterasa de hígado de cerdo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2  
 20 **caracterizada porque** a la subunidad le faltan en el extremo N terminal de 15 a 25 aminoácidos.
4. Subunidad recombinante de esterasas de hígado de cerdo de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores,  
**caracterizada porque** al extremo N terminal está fusionado un dominio de señal de secreción y/o al extremo C  
 25 terminal un dominio de etiqueta.
5. Subunidad recombinante de esterasas de hígado de cerdo de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada  
 porque** como dominio N terminal está fusionada una secuencia señal de factor  $\alpha$ , cuya secuencia codificante está  
 contenida en la SEQ ID NO. 8, o una secuencia señal de ompA, cuya secuencia codificante está contenida en la  
 SEQ ID NO. 10, y/o al extremo C terminal está fusionado un dominio de etiqueta de poli-His y/o un dominio de  
 30 etiqueta myc.
6. Subunidad recombinante de esterasas de hígado de cerdo de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores,  
**caracterizada porque** las subunidades presentan modificaciones postraduccionales.
- 35 7. ADN que codifica para una subunidad de esterasas de hígado de cerdo de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores.
8. ADN que codifica para una subunidad de esterasas de hígado de cerdo de acuerdo con la reivindicación 6,  
**caracterizada porque** contiene en el extremo 3' de la región codificante un codón de terminación.
- 40 9. Vectores que contienen un fragmento de ADN con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.
10. Esterasas de hígado de cerdo recombinantes enzimáticamente activas que contienen subunidades de esterasas  
 45 de hígado de cerdo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6.
11. Esterasas de hígado de cerdo recombinantes enzimáticamente activas de acuerdo con la reivindicación 10,  
**caracterizada porque** las subunidades presentan modificaciones postraduccionales.
- 50 12. Uso de fragmentos de ADN de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 para la preparación de vectores de expresión.
13. Uso de vectores de acuerdo con la reivindicación 9 para la preparación de cultivos de células transfectadas.
14. Uso de fragmentos de ADN de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8 o vectores de acuerdo con la  
 55 reivindicación 9 para la preparación de subunidades de esterasas de hígado de cerdo recombinantes mutantes y  
 enzimas funcionales.
15. Expresión de subunidades de esterasas de hígado de cerdo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 6 con  
 cultivos de células que contienen vectores de acuerdo con la reivindicación 9.
- 60 16. Expresión de esterasas de hígado de cerdo enzimáticamente activas de acuerdo con una de las reivindicaciones  
 10 u 11 con cultivos de células que contienen vectores de acuerdo con la reivindicación 9.
17. Expresión de esterasas de hígado de cerdo enzimáticamente activas de acuerdo con una de las reivindicaciones  
 65 15 ó 16, **caracterizada porque** los cultivos de células usados son organismos unicelulares procariotas o eucariotas.

18. Uso de esterasas de hígado de cerdo de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 u 11 para la división de racematos de ácidos carboxílicos o en la conversión de compuestos prostereogénicos.

Fig. 1

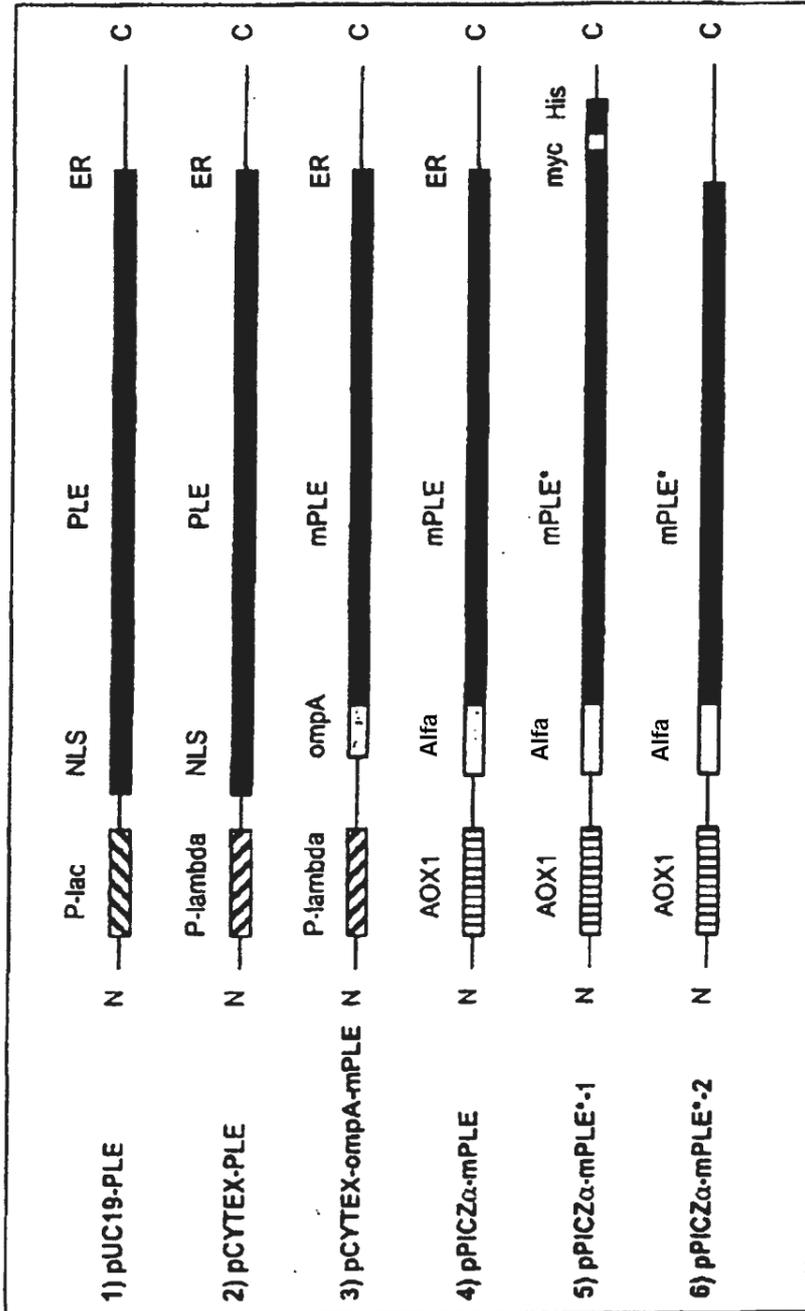


Fig. 2

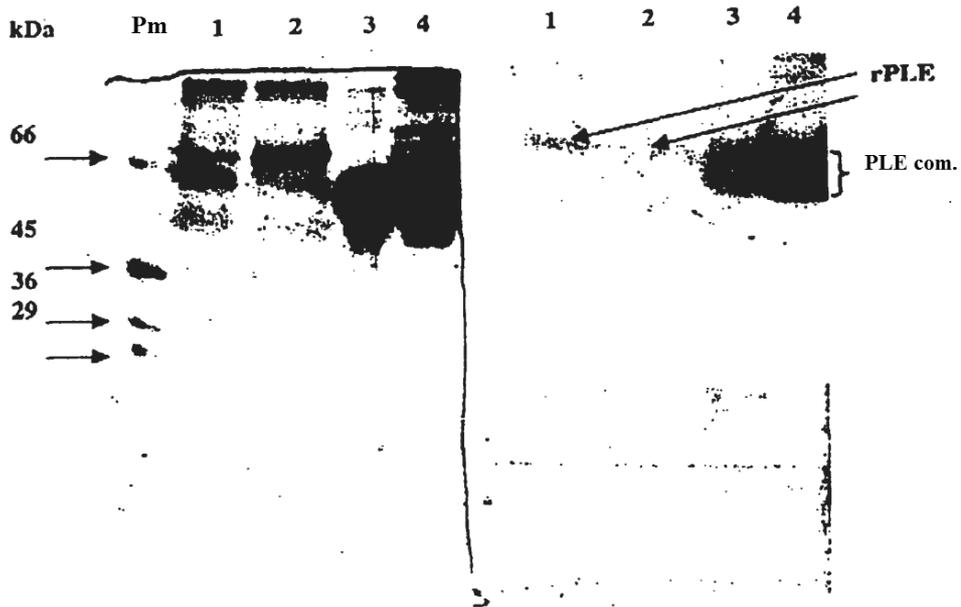


Fig. 3

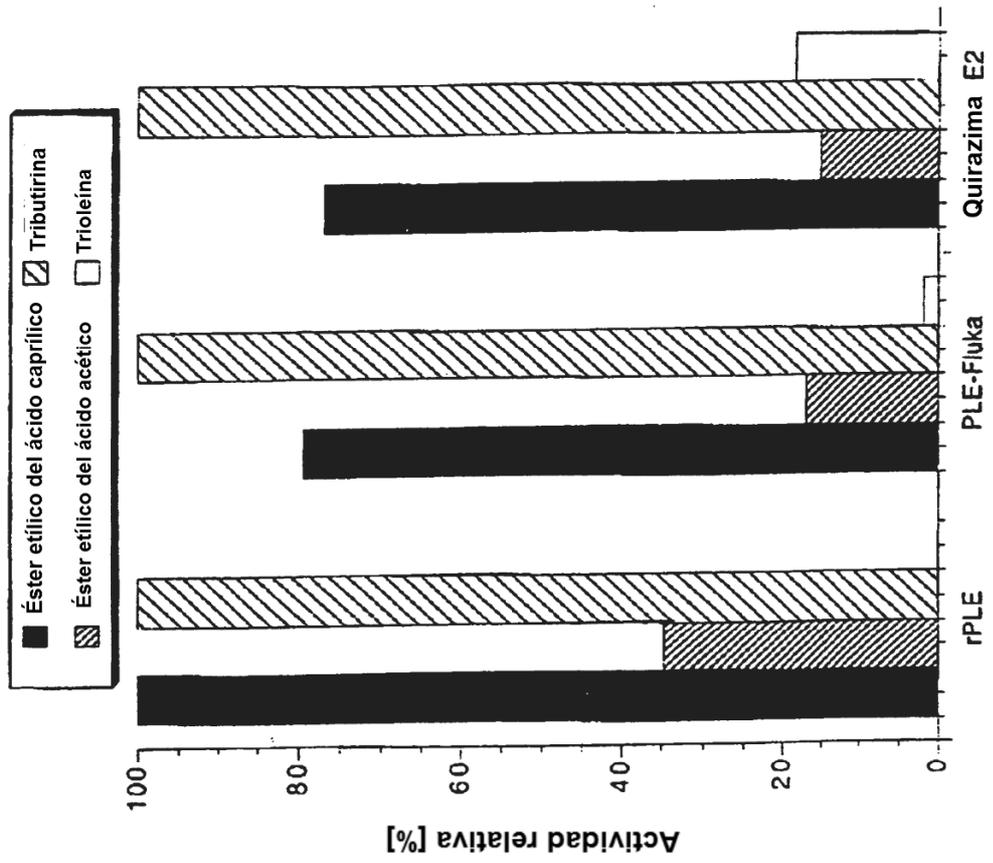
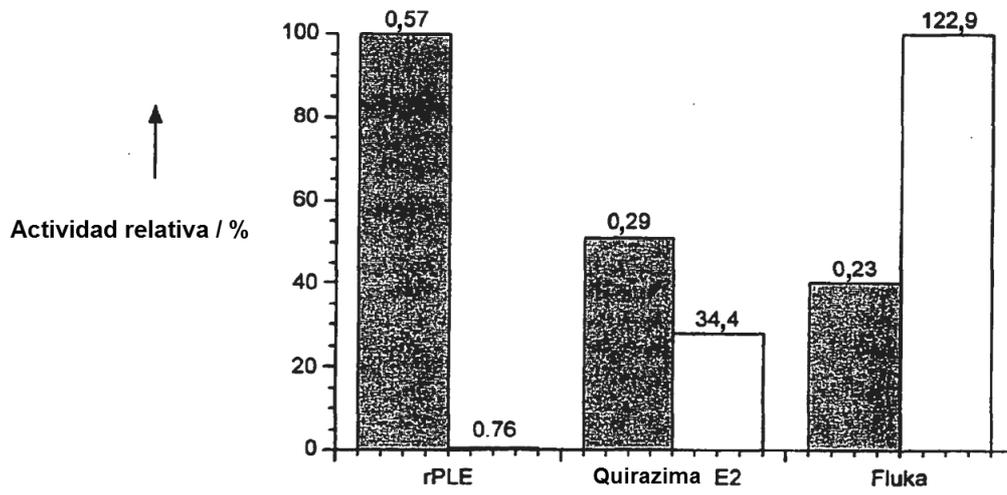
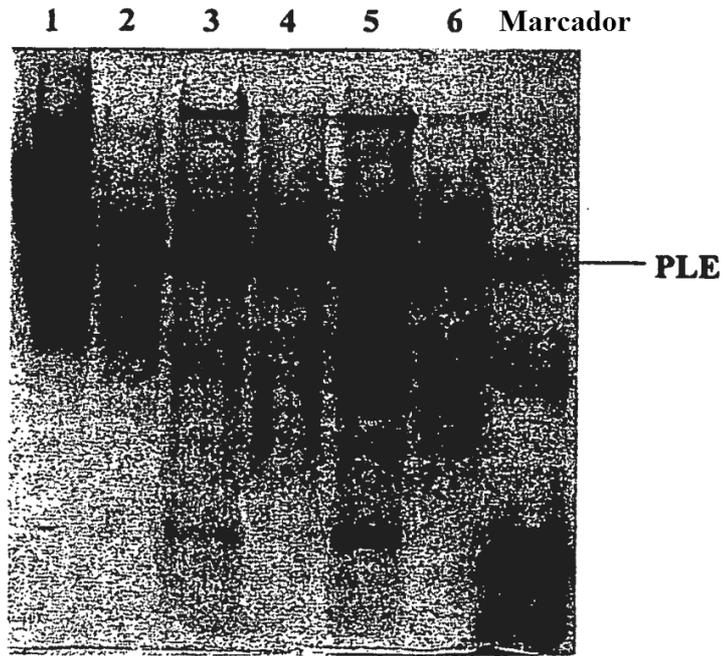


Fig. 4



**Fig. 5**



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- DE 10061864 [0066]

**Literatura no patente citada en la descripción**

- SEEBACH, D. *Chimia*, 1986, vol. 40, 315-318 [0003]
- FARB, D. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980, vol. 203, 214-226 [0003]
- HEYMANN, E. ; JUNGE, W. *Eur. J. Biochem.*, 1979, vol. 95, 509-518 [0003]
- *Eur. J. Biochem.*, 1979, vol. 95, 519-525 [0003]
- LAM, L.K.P. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, vol. 110, 4409-4411 [0003]
- TAKAHASHI, T. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 11565-11571 [0005]
- *FEBS Lett.*, 1991, vol. 280, 297-300 [0005]
- *FEBS Lett.*, 1991, vol. 293, 37-41 [0005]
- LDAVID, L. *Eur. J. Biochem.*, 1998, vol. 257, 142-148 [0005]
- SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. ; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, 1989 [0032]
- CHUNG, C.T. ; NIEMELA, S.L. ; MILLER, R.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989, vol. 86, 2172-2175 [0032]
- MATSUSHIMA, M. *FEBS Lett.*, 1991, vol. 293, 37-41 [0033]
- BELEV, T.N. *Plasmid*, 1991, vol. 26, 147-150 [0034]
- RUA, M.L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 49, 405-410 [0034]
- KREBSFÄNGER, N. *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, vol. 22, 641-646 [0039]
- MATSUDAIRA, P. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 10035-10038 [0040]
- BARRET, A.J. *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. Elsevier, 1977, 181-208 [0042]
- BEER, H.D. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1399, 173-180 [0043]
- GUTMAN, A.L. *Tetrahedron: Assymetry*, 1993, vol. 4, 839-844 [0059]
- K. BURGESS ; LD JENNING. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, vol. 113, 6129 [0059]
- U. P. DHOKTE ; P. M. PATHARE ; V. K. MAHINDROO ; H. C. BROWN. *J. Org. Chem.*, 1998, vol. 63, 8276-8283 [0059]
- CHEN, C. S. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, vol. 104, 7294 [0060]