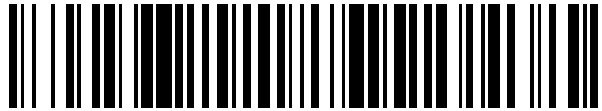


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 070**

51 Int. Cl.:

C12N 9/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2008 E 08717626 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2126065**

54 Título: **Isoformas de esterasa de hígado de cerdo**

30 Prioridad:

23.03.2007 DE 102007014742

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

05.11.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BORNSCHEUER, UWE T.;
HUMMEL, ANKE;
BÖTTCHER, DOMINIQUE;
BRÜSEHABER, ELKE;
DODERER, KAI y
TRAUTHWEIN, HARALD**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 428 070 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

Isoformas de esterasa de hígado de cerdo

La presente invención se refiere a las isoformas de esterasa de hígado de cerdo (γ PLE) citadas en las reivindicaciones, a vehículos que la contienen y a su aplicación en la preparación de alcoholes o ésteres enantioméricamente enriquecidos.

5 Las lipasas y esterases son adecuadas como biocatalizadores eficaces para la preparación de una pluralidad de compuestos ópticamente activos. Sin embargo, aunque comercialmente puede obtenerse una serie completa de lipasas - especialmente de origen microbiano -, solo muy pocas esterases están disponibles en cantidades industriales para su utilización en una resolución de racematos [Bornscheuer, U.T. y Kazlauskas R.J., *Hydrolases in Organic Synthesis* (2005), 2ª ed, Wiley-VCH, Weinheim].

10 A este respecto, se presta especial interés a la esterasa de hígado de cerdo debido a sus interesantes propiedades catalíticas en la síntesis orgánica [Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry* (2004), 5ª ed. Springer, Berlín; Jones, J.B. *Pure Appl. Chem*, (1990), 62, 1445-1448, Jones y col., *Can. J. Chem.* (1985), 63, 452-456; Lam, L.K.P. y col., *J. Org. Chem.* (1986), 51, 2047-2050).

15 Aunque pudo mostrarse que con extractos de esterasa de tejido de hígado de cerdo pueden convertirse parcialmente sustratos con buena estereoselectividad, el uso de aquellos extractos está, no obstante, asociado a una serie de desventajas. Además de las fluctuaciones de la proporción de esterases entre distintos lotes, la presencia de otras hidrolasas se considera especialmente problemática en lo que se refiere a la estereoselectividad (Seebach, D. y col., *25 Chimia* (1986), 40, 315-318). Adicionalmente, existe el problema de que los extractos convencionales están presentes en forma de varias isoenzimas (Farb, D. y col., *Arch. Biochem. Biophys.* (1980) 203, 214-226), que difieren significativamente en su especificidad por sustrato. Heymann, E. y Junge, W. (*Eur. J. Biochem.* (1979), 95, 509-518; *Eur. J. Biochem.* (1979), 95, 519-525) realizaron una costosa separación electroforética, de manera que pudieron aislar fracciones que escinden preferiblemente butirilcolina, prolin- β -naftilamida y butirato de metilo. A diferencia de esto, otras investigaciones muestran (por ejemplo, Lam, L.K.P. y col., *J. Am. Chem. Soc.* (1988) 110, 4409-4411) solamente diferencias en la actividad, pero no en la especificidad de fracciones individuales.

25 Aunque la clonación de genes putativos de esterasa de hígado de cerdo ya se conoce desde hace tiempo (Takahashi, T y col., *J. Biol. Chem.* (1989), 264, 11565-11571; *FEBS Lett.* (1991), 280, 297-300; *FEBS Lett.* (1991), 293, 37-41; David, L. y col., *Eur. J. Biochem.* (1998) 257, 142-148), la expresión recombinante funcional de una esterasa de hígado de cerdo activa solo se ha descrito hasta la fecha en *Pichia pastoris* (Lange, S. y col., *ChemBioChem* (2001), 2, 576-582) o *E. coli* (documento DE 10061864).

30 En la bibliografía también se han descrito aditivos para el medio durante la expresión en *E. coli*. La adición de etanol hasta el 3% (v/v) al medio induce la formación de chaperonas endógenas de *E. coli*, enzimas que sirven de ayuda en el plegamiento y generalmente respaldan el correcto plegamiento (Thomas, JG, *Protein Expression and Purif* (1997), 11, 289-296). Sin embargo, la expresión de la esterasa de hígado de cerdo en Origami de *E. coli* con adición del 3% (v/v) de etanol al medio no condujo a expresión activa detectable de la esterasa en *E. coli*, sino solo a cuerpos de inclusión.

35 En el documento DE10061864 se propone la coexpresión de determinadas chaperonas y de γ PLE. De esta manera pudo generarse por primera vez γ PLE activa a partir de *E. coli*.

40 Resumiendo puede decirse que, aunque es posible la expresión de la esterasa de hígado de cerdo nativa de *E. coli*, sin embargo todavía no está establecida a escala industrial. Además, es útil y necesario mejorar las actividades (del sustrato) de las esterases de hígado de cerdo para además obtener sistemas mejorados que puedan utilizarse preferiblemente a escala industrial en el marco de la preparación biosintética de productos intermedios químicos.

Por tanto, era objetivo de la presente invención la especificación de nuevas esterases mejoradas en comparación con el estado de la técnica. Se prepararán nuevas esterases con actividad y/o selectividad y/o estabilidad mejoradas. Estas esterases serán superiores a las del estado de la técnica, especialmente en cuanto al rendimiento espacio/tiempo y a la enantioselectividad durante la conversión, así como a la especificidad por sustrato alterada o ampliada.

45 Este objetivo se alcanza según las reivindicaciones.

Proporcionando esterases según la SEC ID No. 2 que presentan al menos una mutación, seleccionada del grupo que consisten en:

<u>Posición</u>	<u>Aminoácido</u>
94	E
96	I
97	A, G
98	G
101	L
108	R
113	I
114	P
150	V
154	S
155	T
159	L
160	A
255	F
257	A
258	G
306	P
307	F
308	A
311	L
315	P
323	T
480	A
482	F
484	R

se llega sorprendentemente a especies que cumplen los objetivos mencionados. Mediante mutaciones en estos sitios puede variarse y mejorarse especialmente la especificidad por sustrato, la enantioselectividad y/o la actividad de la γ PLE nativa. La posición se refiere a este respecto naturalmente al primer aminoácido de SEC ID No. 2.

- 5 Son preferidas las esterasas según las SEC ID No. 4, 6, 8 y 10. Éstas presentan en comparación con la γ PLE nativa mejor actividad y/o selectividad y/o estabilidad. Las esterasas según la invención destacan especialmente en cuanto a las actividades, enantioselectividades u otras especificidades por sustrato.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica una esterasa según la invención. Las secuencias de ácidos nucleicos son aquellas de SEC ID No. 3, 5, 7 y 9, o su forma complementaria.

- 10 En otra realización, la presente invención se refiere a genes, sistemas de expresión recombinantes (por ejemplo, microorganismos) o plásmidos/vectores recombinantes que presentan uno o varios de los ácidos nucleicos según la invención.

Por un sistema de expresión se entiende un sistema para la expresión recombinante de los ácidos nucleicos según la invención y, por tanto, para la preparación recombinante de los polipéptidos según la invención. Esta preparación puede realizarse preferiblemente en microorganismos transformados o transfectados u otros huéspedes con secuencias de ácidos nucleicos o vectores correspondientes (véase más adelante) (los términos “transformación” y “transfección” se usan sinónimamente según esta invención). La transformación o transfección pueden realizarse según procedimientos conocidos, por ejemplo, mediante coprecipitación con fosfato de calcio, lipofección, electroporación, procedimiento con PEG/DMSO, bombardeo con partículas o infección viral/por bacteriófagos. La célula según la invención puede contener ácido nucleico recombinante en forma extracromosómica o cromosómicamente integrada. En otras palabras, la transfección/transformación puede ser una transfección/transformación estable o transitoria. El experto conoce protocolos de transfección y transformación (Chan y Cohen. 1979. High Frequency Transformation of *Bacillus subtilis* Protoplasts by Plasmid DNA. *Mol Gen Genet.* 168(1):111-5; Kieser y col., 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation Norwich; Sambrook y col., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. En: segunda ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY.; Irani y Rowe. 1997. Enhancement of transformation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Mg²⁺ and heat. *Biotechniques* 22: 54-56; Balbas, P. y Bolivar, F. (1990), Design and construction of expression plasmid vectors in *E. coli*, *Methods Enzymol.* 185, 14-37; Rodriguez, R.L. y Denhardt, D. T (eds) (1988), *Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses*, 205-225, Butterworth, Stoneham). En relación con la manera de proceder general (PCR, clonación, expresión, etc.) también se remite a la siguiente bibliografía y lo allí citado: manual de usuario del kit Universal GenomeWalker™, Clontech, 3/2000; Triglia T.; Peterson, M. G. y Kemp, D.J. (1988), A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences, *Nucleic Acids Res.* 16, 8186.

Preferiblemente, el huésped es un microorganismo recombinante de origen procariota. Células huésped adecuadas incluyen células de microorganismos unicelulares como células bacterianas. Como microorganismos son de mencionar a este respecto procariotas como *E. coli*, *Bacillus subtilis*. Además, pueden utilizarse bacterias de los géneros/especies *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Campylobacter*, *Caulobacter*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Neisseria*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, así como *Agrobacterium* para la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos según la invención. Preferiblemente se utilizan cepas de *E. coli* para este fin. Se prefieren muy especialmente: XL1 Blue, NM 522, JM101, JM109, JM105, RR1, DH5 α , TOP 10, HB101, BL21 codon plus, BL21 (DE3) codon plus, BL21, Rosetta, Rosetta-gami, MM294, W3110, DSM14459 (documento EP1444367), Origami de *E. coli*. Cepas correspondientes están disponibles en el estado de la técnica y pueden obtenerse, al menos parcialmente, de instituciones de depósito internacionales como ATCC o DMSZ. Al mismo tiempo pueden utilizarse eucariotas, como células de mamífero, células de insecto o células de planta, u organismos como, por ejemplo, levaduras como *Hansenula polymorpha*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, u hongos, como, por ejemplo, *Aspergillus sp.*, para la preparación recombinante de polipéptidos. Células eucariotas adecuadas incluyen células CHO, células HeLa y otras. Muchas de estas células pueden obtenerse de instituciones de depósito como ATCC o DMSZ.

Además, la preparación recombinante de los péptidos según la invención puede realizarse en un huésped no humano. El huésped no humano puede ser una célula o un organismo de pluri a policelular. Organismos policelulares adecuados incluyen sistemas de modelo familiares en la biología molecular como *Drosophila melanogaster*, pez cebra o *C. elegans*. Los animales transgénicos no humanos pueden prepararse según procedimientos conocidos según el estado de la técnica. El animal transgénico no humano puede presentar preferiblemente distintas constituciones genéticas. Puede (i) expresar en exceso constitutiva o induciblemente el gen de una secuencia de ácidos nucleicos según la invención, (ii) contener el gen endógeno de una secuencia de ácidos nucleicos según la invención en forma inactivada, (iii) contener el gen endógeno de una secuencia de ácidos nucleicos según la invención completamente o parcialmente sustituido con un gen mutado de una secuencia de ácidos nucleicos según la invención, (iv) presentar una expresión en exceso o expresión por defecto condicional y específica para tejido del gen de una secuencia de ácidos nucleicos según la invención o (v) presentar una inactivación del gen condicional y específica para tejido de una secuencia de ácidos nucleicos según la invención.

El animal transgénico, preferiblemente contiene además un gen exógeno de una secuencia de ácidos nucleicos según la invención bajo el control de un promotor que permite su sobre-expresión. Alternativamente, el gen endógeno de una secuencia de ácidos nucleicos según la invención puede sobre-expresarse mediante activación o/y sustitución del promotor endógeno. El promotor endógeno del gen de una secuencia de ácidos nucleicos según la invención presenta preferiblemente una modificación genética que conduce a una sobre-expresión de dicho gen. La modificación genética del promotor endógeno comprende a este respecto tanto una mutación de una única base como también mutaciones por delección e inserción. En una forma de realización especialmente preferida del huésped, éste es un roedor transgénico, preferiblemente un ratón transgénico, un conejo transgénico, una rata transgénica, o una oveja transgénica, una vaca transgénica, una cabra transgénica o un cerdo transgénico. Los ratones tienen numerosas ventajas en comparación con otros animales. Son fáciles de mantener y su fisiología es válida como sistema modelo para la del ser humano. La preparación de aquellos animales genéticamente manipulados es suficientemente conocida para el experto y se realiza según procedimientos habituales (véase, por ejemplo, Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. y Lacy, E. (1994), *Manipulating the Mouse-Embryo; A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY;

documento WO91/08216). Alternativamente o adicionalmente también pueden utilizarse sistemas de cultivo celular, especialmente sistemas de cultivo de células humanas, para las aplicaciones que se han descrito para el animal transgénico no humano.

5 Otra realización de la invención se refiere a genes completos que presentan los ácidos nucleicos según la invención. Por gen se entiende según la solicitud una sección al nivel molecular que puede estar fundamentalmente constituida por dos regiones diferentes:

- una región de ADN a partir de la cual se prepara una copia de ARN monocatenario mediante transcripción
- todas las secciones de ADN adicionales que participan en la regulación de este proceso de copiado.

Definiciones más precisas pueden extraerse de la página: <http://de.wikipedia.org/wiki/Gen>.

10 Las secuencias de ácidos nucleicos codificantes pueden clonarse en plásmidos/vectores convencionales y expresarse después de la transfección de microorganismos u otras células huésped con aquellos vectores en el cultivo celular. Como plásmidos o vectores se consideran en principio todas las formas de realización puestas a disposición para el experto para este fin. Los plásmidos y vectores de este tipo pueden extraerse, por ejemplo, de Studier y colaboradores (Studier, W. F.; Rosenberg A. H.; Dunn J. J.; Dubendorff J. W.; Use of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, Methods Enzymol. 1990, 185, 61-89) o de folletos de las empresas Novagen, Promega, New England Biolabs, Clontech o Gibco BRL. Otros plásmidos y vectores preferidos pueden encontrarse en: Glover, D. M. (1985), DNA cloning: a practical approach, vol. I-III, IRL Press Ltd., Oxford; Rodriguez, R.L. y Denhardt, D. T (eds) (1988), Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses, 179-204, Butterworth, Stoneham; Goettel, D. V., Systems for heterologous gene expression, Methods Enzymol. 1990, 185, 3-7; Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. Plásmidos con los que puede clonarse la secuencia de ácidos nucleicos según la invención o una construcción génica que la contiene de manera muy especialmente preferida en el organismo huésped son: pUC18 (Roche Biochemicals), pKK-177-3H (Roche Biochemicals), pBTac2 (Roche Biochemicals), pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech), pKK-233-3 (Stratagene) o pET (Novagen). Vectores adecuados también son, por ejemplo, pET-21a(+) para *E. coli*, pero también pueden usarse otros vectores de expresión para organismos unicelulares procariontes, así como vectores para eucariotes. Han demostrado ser vectores adecuados para levaduras, por ejemplo, el vector pREP o el vector pINT. Para la expresión en células de insecto son adecuados, por ejemplo, vectores de baculovirus como se describen en los documentos EP127839 o EP549721, y para la expresión en células de mamífero, por ejemplo, vectores SV40, que pueden obtenerse en general. Se prefieren especialmente vectores para organismos eucariotes unicelulares, especialmente del grupo de los vectores pET para la transformación de células de *E. coli*, especialmente Origami de *E. coli*.

En una forma de realización especialmente preferida, la secuencia de ácidos nucleicos según la invención introducida en el vector está además fusionada con una cola de histidinas proporcionada por el vector. Se prefiere clonar la secuencia de ácidos nucleicos introducida en el vector de pET preferido de manera que la transcripción esté bajo el control del promotor regulable de IPTG presente en el vector. Alternativamente también se utilizan preferiblemente promotores regulables por ramnosa.

Los vectores pueden contener, además de los marcadores habituales, como, por ejemplo, genes resistentes a antibióticos, otras secuencias de nucleótidos funcionales para la regulación, especialmente para la represión o inducción de la expresión del gen ADH y/o un gen indicador. Como promotores se utilizan preferiblemente promotores débiles regulables como, por ejemplo, el promotor rha o el promotor nmt1, o promotores fuertes regulables como, por ejemplo, el promotor lac, ara, lambda, pL, T7 o T3. Los fragmentos de ADN codificantes deben ser transcribibles de un promotor en los vectores. Otros promotores probados son, por ejemplo, el promotor de la poliedrina de baculovirus para la expresión en células de insecto (véase, por ejemplo, el documento EP127839) o el promotor temprano SV40 o los promotores LTR, por ejemplo, de MMTV (virus del tumor mamario de ratón; Lee y col. (1981) Nature, 294 (5838), 228-232).

Los genes, vectores/plásmidos según la invención pueden contener en consecuencia otras regiones de secuencia funcionales como, por ejemplo, un punto de iniciación de la replicación, operadores o señales de terminación.

En una forma de realización especialmente ventajosa, la presente invención se refiere a microorganismos recombinantes que, además de la secuencia de ácidos nucleicos según la invención, también contienen uno o varios genes chaperona clonados. Como chaperonas preferidas se consideran GroEL y GroES, preferiblemente en una cepa Origami de *E. coli*. Sorprendentemente, una expresión de la enzima activa se consigue en presencia de estas dos proteínas de ayuda en el plegamiento, aunque otros sistemas de chaperona alternativos como, por ejemplo, las chaperonas endógenas de *E. coli*, inducidos por la adición de etanol u otras chaperonas coexpresadas como DnaK, DnaJ y GrpE, no fueron satisfactorios (documento DE 10061864).

Para el experto es sorprendente que una coexpresión equivalente de los sistemas de chaperonas DnaK, DnaJ, GrpE y GroEL, GroES, o la coexpresión de GroEL o GroES solos junto con la esterasa de hígado de cerdo en Origami de *E. coli*,

solo conduzca a una expresión en forma de cuerpos de inclusión, y no a una actividad detectable en extracto de células en bruto de *E. coli*. Por tanto, en cualquier caso se prefiere que el sistema de chaperonas GroEL / GroES sea el sistema preferiblemente inducido / expresado, aún cuando estén presentes otros sistemas de chaperonas al mismo tiempo en el organismo huésped.

5 La expresión funcional de proteínas eucariotas en *E. coli* representa una gran reto, especialmente en caso de que se trate de proteínas postraduccionales glicosiladas. En caso de la expresión recombinante de la esterasa de hígado de cerdo en *E. coli*, la utilización del sistema de chaperonas especial GroEL, GroES compensa aparentemente la falta de glicosilación postraducciona. Con referencia a esta configuración y su realización se remite al documento DE102006031600.

10 En la siguiente configuración, la presente invención se refiere al uso de los polipéptidos recombinantes (rec) según la invención para la preparación de alcoholes, ácidos carboxílicos o ésteres enantioméricamente enriquecidos, especialmente a partir de mesoformas de los compuestos ya mencionados como, por ejemplo, ésteres de ácidos dicarboxílicos dado el caso sustituidos como ésteres de ácido malónico.

15 Es posible el uso de las enzimas en forma inmovilizada (Sharma B. P.; Bailey L. F. y Messing R. A. (1982), Immobilisierte Biomaterialien - Techniken und Anwendungen, Angew. Chem. 94, 836-852). La inmovilización se realiza ventajosamente mediante liofilización (Paradkar, V. M.; Dordick, J. S. (1994), Aqueous-Like Activity of α -Chymotrypsin Dissolved in Nearly Anhydrous Organic Solvents, J. Am. Chem. Soc. 116, 5009-5010; Mori, T.; Okahata, Y. (1997), A variety of lipi-coated glycoside hydrolases as effective glycosil transfer catalysts in homogeneous organic solvents, Tetrahedron Lett. 38, 1971-1974; Otamiri, M.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. (1992), Complex formation between chymotrypsin and ethyl cellulose as a means to solubilize the enzyme in active form in toluene, Biocatalysis 6, 291-305). Se prefiere muy especialmente la liofilización en presencia de sustancias tensioactivas como Aerosol OT o polivinilpirrolidona o polietilenglicol (PEG) o Brij 52 (éter monocetílico de dietilenglicol) (Kamiya, N.; Okazaki, S.-Y.; Goto, M. (1997), Surfactant-horseradish peroxidase complex catalytically active in anhydrous benzene, Biotechnol. Tech. 11, 375-378).

20

25 Se prefiere particularmente la inmovilización sobre Eupergit®, especialmente Eupergit C® y Eupergit 250L® (Röhm) (como visión general véase: E. Katchalski-Katzir, D. M. Kraemer, J. Mol. Catal. B: Enzym. 2000, 10, 157). Igualmente se prefiere la inmovilización sobre Ni-NTA en combinación con el péptido modificado por unión a una cola de His (hexahistidina) (Petty, K.J. (1996), Metal-chelate affinity chromatography. En: Ausubel, F.M. y col. eds. Current protocols in Molecular Biology, vol. 2, Nueva York: John Wiley and Sons).

30 También es posible el uso como CLEC (St. Clair, N.; Wang, Y.-F.; Margolin, A. L. (2000), Cofactor-bound cross-linked enzyme crystals (CLEC) of alcohol dehydrogenase, Angew. Chem. Int. Ed. 39, 380-383).

Mediante estas medidas se logra generar a partir de polipéptidos recombinantes (rec), que se vuelven inestables mediante disolventes orgánicos, polipéptidos que pueden trabajar en mezclas de disolventes acuosos y orgánicos o completamente en medios orgánicos.

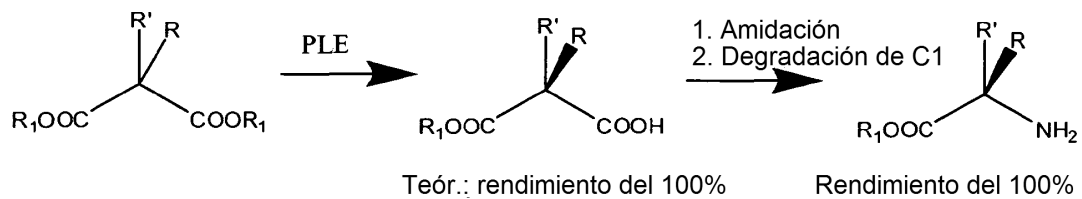
35 Para la reacción de ésteres o ácidos carboxílicos y alcoholes con los polipéptidos según la invención se procede preferiblemente del siguiente modo. Los polipéptidos se añaden en la forma deseada (libres, inmov., en organismos huésped o en forma discrecionalmente altamente digerida) al medio correspondiente, preferiblemente la disolución acuosa. Manteniendo el intervalo de temperatura óptimo o de valor de pH óptimo, el sustrato se añade a esta mezcla. Después de realizarse la reacción, el alcohol o éster obtenido puede aislarse de la mezcla de reacción según procedimientos conocidos para el experto (cristalización, extracción, cromatografía).

40 La reacción enzimática de ésteres o ácidos carboxílicos y alcoholes en alcoholes, ácidos carboxílicos o ésteres enantioméricamente enriquecidos mediante esterases es en principio conocida para el experto (véanse las referencias citadas al principio; Esquema 2). En este contexto son especialmente interesantes las reacciones de mesoformas de los derivados ya mencionados. La conversión según la invención repercute aquí positivamente de modo que un producto enantioméricamente enriquecido puede alcanzar el 100% de rendimiento, mientras que en resoluciones de racematos normales solo puede obtenerse como máx. el 50% de rendimiento de los enantiómeros respectivos. Así, por ejemplo, en la utilización de determinados diésteres de ácido malónico sustituidos pueden obtenerse productos enantioméricamente enriquecidos que son valiosos productos intermedios en la síntesis química. Así, de modo y manera eficiente y sencillo pueden prepararse los monoésteres de ácido aminocarboxílico asimétricos enantioméricamente enriquecidos correspondientes a partir de diésteres de ácido aminomalónico opcionalmente protegidos en N. Además, es interesante la secuencia de reacción representada en el siguiente Esquema 1.

45

50

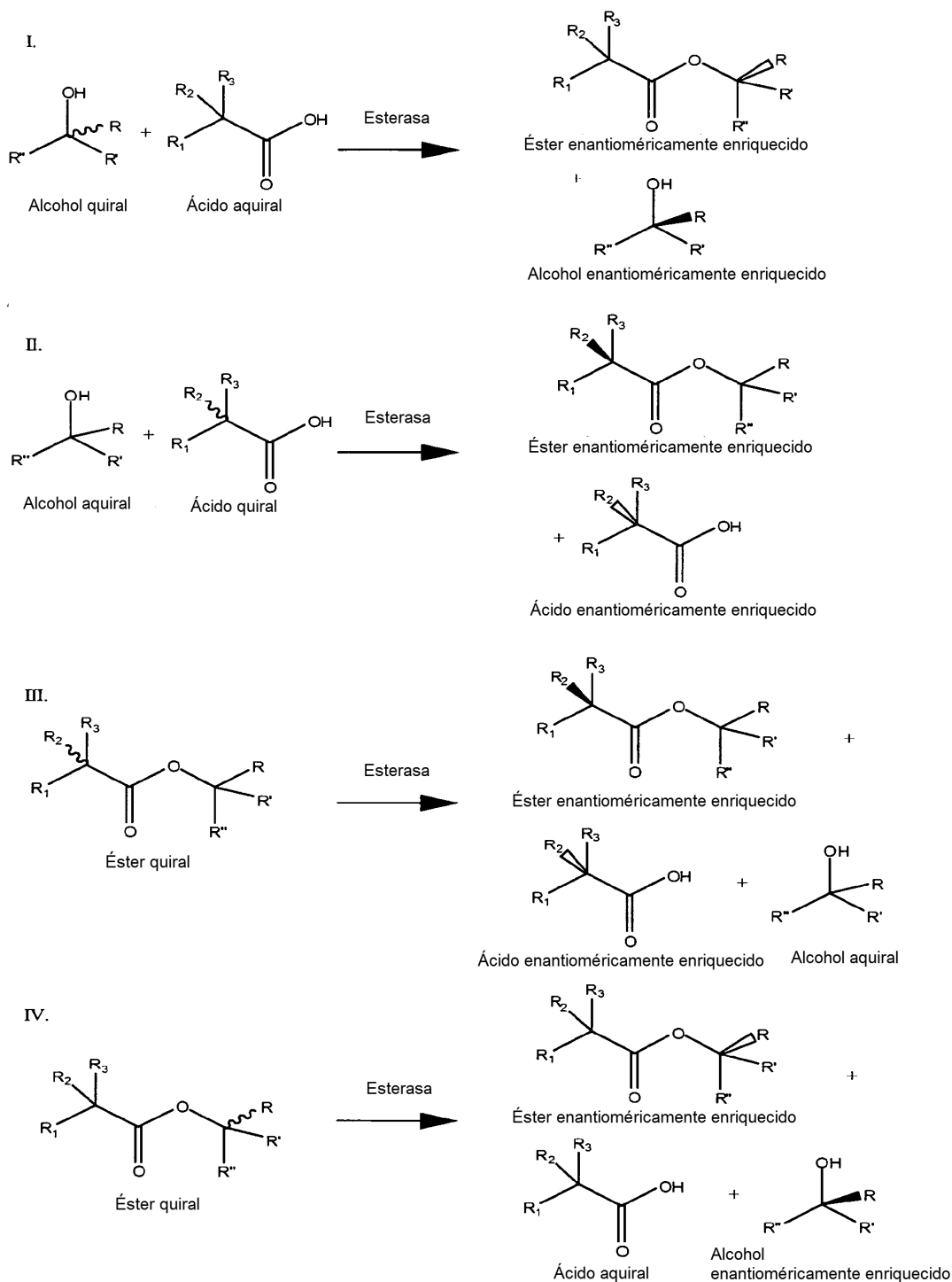
Esquema 1:



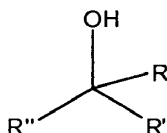
Los restos que se consideran útiles para esta reacción pueden extraerse de la siguiente lista.

- 5 Las medidas para la amidación y para la degradación de C1 son suficientemente conocidas para el experto (Organikum, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlín, 1986, pág. 388 y siguientes, pág. 571 y siguientes).

Esquema 2

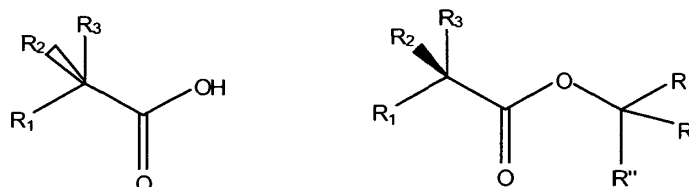


Ejemplos de alcoholes enantioméricamente enriquecidos pueden prepararse a partir de los correspondientes ésteres quirales I ó IV o con ayuda de éstos pueden también prepararse ésteres enantioméricamente enriquecidos, igualmente conocidos para el experto. Por ejemplo, éstos pueden resumirse bajo la siguiente fórmula general



C₈-alquilo, arilo (C₆-C₁₈), aralquilo (C₇-C₁₉), heteroarilo (C₃-C₁₈), heteroaralquilo (C₄-C₁₉), alquil (C₁-C₈)-arilo (C₆-C₁₈), alquil (C₁-C₈)-heteroarilo (C₃-C₁₈), cicloalquilo (C₃-C₈), alquil (C₁-C₈)-cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₈), o R y R' y/o R y R'' y/o R' y R'' forman un puente alquilenos (C₃-C₅).

Ejemplos de ésteres o ácidos enantioméricamente enriquecidos pueden asignarse a las siguientes fórmulas generales



5 en las que R, R' y R'' son iguales o distintos entre sí, especialmente H, alquilo (C₁-C₈), alcoxi (C₁-C₈), HO-alquilo (C₁-C₈), alcoxi (C₂-C₈)-alquilo, arilo (C₆-C₁₈), aralquilo (C₇-C₁₉), heteroarilo (C₃-C₁₈), heteroaralquilo (C₄-C₁₉), alquil (C₁-C₈)-arilo (C₆-C₁₈), alquil (C₁-C₈)-heteroarilo (C₃-C₁₈), cicloalquilo (C₃-C₈), alquil (C₁-C₈)-cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₈), o R y R' o R y R'' o R' y R'' forman un puente de alquilenos (C₃-C₅) y R₁, R₂ y R₃ son distintos entre sí, especialmente H, alquilo (C₁-C₈), alcoxi (C₁-C₈), HO-alquilo (C₁-C₈), alcoxi (C₂-C₈)-alquilo, ciclopentadienilo, arilo (C₆-C₁₈), aralquilo (C₇-C₁₉), heteroarilo (C₃-C₁₈), heteroaralquilo (C₄-C₁₉), alquil (C₁-C₈)-arilo (C₆-C₁₈), alquil (C₁-C₈)-heteroarilo (C₃-C₁₈), cicloalquilo (C₃-C₈), alquil (C₁-C₈)-cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₈) o R₁ y R₂ y/o R₁ y R₃ y/o R₂ y R₃ forman un puente de alquilenos (C₃-C₅).

15 Para el uso según la invención son adecuados disolventes acuosos que están tamponados correspondientemente. Sin embargo, también es posible realizar la reacción con una unidad automática pH-Stat [empresa: Schott AG, Mainz, marca TitroLine alpha].

20 La reacción se realiza preferiblemente a una temperatura entre 0 °C y 85 °C, más preferiblemente entre 30 y 80 °C, muy especialmente preferible a aproximadamente 50 °C. El experto también tiene libre elección del valor de pH de la reacción, pudiendo realizarse la reacción tanto a un valor de pH fijo como también con variación del valor de pH en un intervalo de pH. El valor de pH se elige especialmente considerando un resultado de reacción óptimo según el presente objetivo. La reacción se realiza preferiblemente a un valor de pH que se encuentra a pH 5 a 9, preferiblemente pH 6 a 8, y con especial preferencia pH 6,5 a 7,5.

25 Para la aplicación, el polipéptido considerado - como ya se ha considerado más arriba - puede usarse en forma nativa como compuestos homogéneamente purificados o como enzima recombinantemente preparada. Además, el polipéptido recombinante (rec) también puede utilizarse como constituyente de un organismo huésped intacto o junto con la masa celular de organismo huésped digerida y discrecionalmente altamente purificada.

30 Si la conversión del sustrato utilizado en el producto deseado se realiza en cultivo celular, por ejemplo, utilizando un huésped adecuado, se usa un medio nutritivo adecuado dependiendo del organismos huésped usado o del cultivo celular usado. Los medios adecuados para las células huésped son en general conocidos y pueden obtenerse comercialmente. A los cultivos celulares pueden añadirse además aditivos habituales como, por ejemplo, antibióticos, agentes promotores del crecimiento como, por ejemplo, sueros (suero bovino fetal, etc.) y aditivos conocidos similares.

Otras condiciones de reacción óptimas pueden extraerse del documento DE102006031600.

Otra aplicación se refiere a la preparación de un polipéptido con actividad y/o selectividad y/o estabilidad mejoradas en comparación con el polipéptido de SEC ID No.: 2 mediante

- 35 i) mutagénesis del ácido nucleico según la invención, preferiblemente el de SEC 3, 5, 7, 9,
- ii) clonación de la secuencia de ácidos nucleicos obtenida a partir de i) en un vector adecuado con posterior transformación en un sistema de expresión adecuado y
- iii) detección y aislamiento del correspondiente polipéptido con actividad y/o selectividad y/o estabilidad mejoradas.

40 La manera de proceder para mejorar las secuencias de ácidos nucleicos según la invención o los polipéptidos codificados por ellas mediante procedimientos de mutagénesis es suficientemente conocida para el experto. Como procedimientos de mutagénesis se consideran todos los procedimientos puestos a disposición del experto para este fin. Éstos son especialmente la mutagénesis por saturación, la mutagénesis al azar, procedimientos de recombinación *in vitro*, así como mutagénesis dirigida a sitio (Eigen, M. y Gardiner, W., Evolutionary molecular engineering based on RNA replication, Pure Appl. Chem. 1984, 56, 967-978; Chen, K. y Arnold, F., Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. Bio/Technology 1991, 9, 1073-1077; Horwitz, M. y Loeb, L., Promoters Selected From Random DNA-Sequences, Proc Natl Acad Sci USA 83, 1986, 7405-7409; Dube, D. y

L. Loeb, Mutants Generated By The Insertion Of Random Oligonucleotides Into The active-Site Of The Beta-Lactamase Gene, *Biochemistry* 1989, 28, 5703-5707; Stemmer, P.C., Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, *Nature* 1994, 370, 389-391 y Stemmer, P.C., DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 1994, 10747-10751).

- 5 Las nuevas secuencias de ácidos nucleicos obtenidas se clonan en un organismo huésped (para referencias véase más adelante) según los procedimientos especificados más adelante y los péptidos así expresados se detectan con procedimientos de cribado adecuados y a continuación se aíslan. Para la detección son fundamentalmente adecuadas todas las posibles reacciones de detección para las moléculas formadas con este polipéptido. Para esto sirven especialmente pruebas fotométricas mediante NADH formada o consumida, procedimientos de HPLC o de CG para la
- 10 detección de los alcoholes formados con esta enzima. Para la detección de nuevos polipéptidos modificados por procedimientos de ingeniería genética también son además adecuados procedimientos de detección de electroforesis en gel o procedimientos de detección mediante anticuerpos.

Por compuestos ópticamente enriquecidos (enantioméricamente enriquecidos) se entiende en el marco de la invención la presencia de una antípoda óptica en mezcla con la otra en >50% en moles.

- 15 Por el término secuencias de ácidos nucleicos se resumen todos los tipos de ADN monocatenario o bicatenario, como también ARN o mezclas de los mismos. La secuencia de ácidos nucleicos según la invención puede ser en consecuencia una molécula de ADN o de ARN. Se prefiere que la molécula de ácido nucleico sea una molécula de ADNc o de ARNm. Según la invención, la molécula de ADN puede ser además una molécula de ADN genómico. Además, la invención comprende formas de realización en las que la molécula de ADN es una molécula de PNA u otro derivado de una
- 20 molécula de ADN.

El término "complementario" significa según la invención que la complementariedad se extiende sobre la región entera de la molécula de ácido nucleico según la invención sin huecos. En otras palabras, según la invención se prefiere que la complementariedad al 100% se extienda sobre la región entera de la secuencia según la invención, es decir, del extremo 5' representado hasta el extremo 3' representado.

- 25 La mejora de la actividad y/o selectividad y/o estabilidad significa según la invención que los polipéptidos son más activos y/o más selectivos o más estables bajo las condiciones de reacción usadas. Mientras que la actividad y la estabilidad de las enzimas será naturalmente lo más alta posible para la aplicación industrial, se habla de una mejora con respecto a la selectividad cuando la selectividad por el sustrato disminuye, pero aumenta la enantioselectividad de las enzimas. Lo mismo aplica cambiando lo que se deba cambiar a la expresión no esencialmente reducida usada en este contexto.

- 30 Las secuencias de proteínas y las secuencias de ácidos nucleicos reivindicadas también comprenden según la invención aquellas secuencias que presentan una homología (exclusiva de la degeneración natural) superior al 97%, preferiblemente superior al 97,5%, 98% o al 98,5%, más preferiblemente superior al 99% o al 99,5% con respecto a una de estas secuencias, siempre y cuando se mantenga el modo de acción o el fin de una secuencia tal. La expresión "homología" (o identidad) como se usa en el presente documento puede definirse por la ecuación $H (\%) = [1 - V/X] \times 100$ en la que H
- 35 significa homología, X es el número total de nucleobases/aminoácidos de la secuencia comparativa y V es el número de nucleobases/aminoácidos diferentes de la secuencia que va a considerarse referido a la secuencia comparativa. En cualquier caso, con el término secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos están comprendidas todas las secuencias que aparecen posiblemente según la degeneración del código genético.

- 40 La expresión "bajo condiciones rigurosas" se entiende en el presente documento como se describe en Sambrook y col. (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York). Preferiblemente, una hibridación es rigurosa según la presente invención cuando después de lavar durante una hora con 1 x SSC (cloruro sódico 150 mM, citrato de sodio 15 mM, pH 7,0) y 0,1% de SDS (dodecilsulfato de sodio) a 50 °C, preferiblemente a 55 °C, más preferiblemente a 62°C y lo más preferido a 68°C, y más preferiblemente durante 1 hora con 0,2 x SSC y 0,1% de SDS a 50 °C, lo más preferido a 55 °C, más preferiblemente a 62
- 45 °C y lo más preferido a 68 °C, todavía se observa una señal de hibridación positiva.

Como restos alquilo (C₁-C₈) se consideran metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo o octilo, junto con todos sus isómeros de unión.

Un resto alquilo (C₁-C₂₀) es en el marco de la definición según la invención un resto correspondiente con 1 a como máx. 20 átomos de C.

- 50 Un resto alquilo (C₃-C₂₀) es en el marco de la definición según la invención un resto correspondiente con 3 a como máx. 20 átomos de C.

El resto alcoxi (C₁-C₈) se corresponde con el resto alquilo (C₁-C₈) con la condición de que éstos estén unidos por un átomo de oxígeno.

Como alcoxi (C₂-C₈)-alquilo se indica restos en los que la cadena alquilo está interrumpida por al menos una función oxígeno, no pudiendo estar unidos entre sí dos átomos de oxígeno. El número de átomos de carbono indica el número total de átomos de carbono contenidos en el resto.

5 Un puente de alquileo (C₃-C₅) es una cadena de carbonos con tres a cinco átomos de C, estando unida esta cadena por dos átomos de C distintos a la molécula considerada.

Los restos ya descritos pueden estar sustituidos una vez o varias veces con halógenos y/o alcoxi (C₁-C₈)-carbonilo y/o restos que contienen N, O, P, S, Si. Estos son especialmente restos alquilo del tipo anteriormente mencionado que presentan uno o varios de estos heteroátomos en su cadena, o que están unidos a la molécula mediante uno de estos heteroátomos.

10 Por cicloalquilo (C₃-C₈) se entiende restos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo, etc. Estos pueden estar sustituidos con uno o varios halógenos y/o restos que contienen átomos de N, O, P, S, Si y/o presentar átomos de N, O, P, S en el anillo como, por ejemplo, 1-, 2-, 3-, 4-piperidilo, 1-, 2-, 3-pirrolidinilo, 2-, 3-tetrahidrofurilo, 2-, 3-, 4-morfolinilo.

15 Un resto cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₈) designa un resto cicloalquilo como se ha representado anteriormente que está unido a la molécula mediante un resto alquilo como se ha especificado anteriormente.

Alcoxi (C₁-C₈)-carbonilo significa en el marco de la invención un resto alquilo como se ha definido anteriormente con como máx. 8 átomos de C que está unido mediante una función O(C=O).

Aciloxi (C₁-C₈) significa en el marco de la invención un resto alquilo como se ha definido anteriormente con como máx. 8 átomos de C que está unido mediante una función (C=O)O.

20 Acilo (C₁-C₈) significa en el marco de la invención un resto alquilo como se ha definido anteriormente con como máx. 8 átomos de C que está unido mediante una función (C=O).

25 Por un resto arilo (C₆-C₁₈) se entiende un resto aromático con 6 a 18 átomos de C. Especialmente figuran entre estos compuestos como restos fenilo, naftilo, antrilo, fenantrilo, bifenilo o sistemas del tipo previamente descrito condensados con la molécula en cuestión como, por ejemplo, sistemas de indenilo que dado el caso pueden estar sustituidos con alquilo (C₁-C₈), alcoxi (C₁-C₈), alcoxi (C₂-C₈)-alquilo, NH-alquilo (C₁-C₈), N(alquilo (C₁-C₈))₂, OH, O-alquilo (C₁-C₈), NO₂, NH-acilo (C₁-C₈), N(acilo (C₁-C₈))₂, F, Cl, CF₃, acilo (C₁-C₈), aciloxi (C₁-C₈), resto aralquilo (C₇-C₁₉), heteroaralquilo (C₄-C₁₉).

Un resto aralquilo (C₇-C₁₉) es un resto arilo (C₆-C₁₈) unido a la molécula mediante un resto alquilo (C₁-C₈).

30 Un resto heteroarilo (C₃-C₁₈) designa en el marco de la invención un sistema de anillo aromático de cinco, seis o siete miembros de 3 a 18 átomos de C que presenta en el anillo heteroátomos como, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno o azufre. Como aquellos compuestos heteroaromáticos se consideran especialmente restos como 1-, 2-, 3-furilo, como 1-, 2-, 3-pirrolilo, 1-, 2-, 3-tienilo, 2-, 3-, 4-piridilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-indolilo, 3-, 4-, 5-pirazolilo, 2-, 4-, 5-imidazolilo, acridinilo, quinolinilo, fenantridinilo, 2-, 4-, 5-, 6-pirimidinilo. Los compuestos heteroaromáticos pueden estar sustituidos de la misma forma que los restos arilo (C₆-C₁₈) anteriormente mencionados.

35 Por un heteroaralquilo (C₄-C₁₉) se entiende un sistema heteroaromático correspondiente al resto aralquilo (C₇-C₁₉).

Como halógenos (Hal) se consideran flúor, cloro, bromo y yodo.

Por el término disolvente acuoso se entiende agua o una mezcla de disolventes principalmente constituida por agua con disolventes orgánicos solubles en agua como, por ejemplo, alcoholes, especialmente metanol o etanol, o éteres, como THF o dioxano, u otros codisolventes como DMSO.

40 Las referencias mencionadas en este documento se consideran comprendidas por la presente divulgación.

Las secuencias de proteínas representadas en el protocolo de secuencias contienen en el extremo C adicionalmente una cola de His y una secuencia de unión. Por tanto, las actuales secuencias de proteínas que representan las γ PLE activas son las secuencias representadas en el protocolo de secuencias y trucadas en 21 aminoácidos en el extremo C. Análogamente se aplica a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican estas secuencias de proteínas.

45 Procedimientos:

Aislamiento de ARNm y síntesis de ADNc

Tejido de hígado de cerdo fresco (0,1 g) se mezcló con el reactivo Trizol® (kit de purificación de ARN TRIZOL® Plus, Invitrogen, CA, EE.UU.), se homogeneizó (10 min a TA; Ultraturrax T25, IKA-Labortechnik) y el ARN se aisló según

indicaciones del fabricante. La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente. La síntesis de ADNc se realizó mediante RT-PCR usando cebadores oligo(dT)₁₅ y transcriptasa inversa de MMLV con actividad de RNasa H (Promega, Madison, WI, EE.UU.) según el protocolo del fabricante.

Amplificación y clonación de genes PLE

5 El producto de RT-PCR se utilizó para la amplificación de genes PLE con dos cebadores específicos para genes que se basan en la secuencia de γ PLE (5'-CACCCATATGGGGCAGCCAGCCTCGC-3' (SEC ID No.: 11), con el sitio de escisión de la restricción marcado en cursiva para NdeI y 5'-CCGCTCGAGTCACTTTATCTTGGGTGGCTTCTTTGC-3' (SEC ID No.: 12), con el sitio de escisión de la restricción marcado en cursiva para XhoI; están subrayados el codón de iniciación y de parada). El cebador directo contiene además en su extremo 5' las bases CACC que hacen posible la posterior clonación en un vector TOPO (véase más adelante). Estos cebadores ya eliminan la secuencia señal de 18 aminoácidos de longitud unida al extremo N en el gen porcino original, así como la señal de retención del RE (retículo endoplasmático) del extremo C de 4 aminoácidos de longitud, lo que facilita la posterior expresión en *E. coli* (Lange, S, y col., ChemBioChem (2001), 2, 576 - 582). La PCR se realizó en un ciclador térmico (Techne Progene, Jepson Bolton Laboratory Equipment, Watford, Reino Unido). Para la PCR se usó Pfu Plus Polymerase (Roboklon, Berlín, Alemania) según indicaciones del fabricante y el siguiente programa de temperatura: después de una desnaturalización de cinco minutos a 95 °C se llevaron a cabo 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C, 3 min a 72 °C, así como finalmente 7 min a 72 °C. Los productos de PCR se separaron sobre un gel de agarosa, se purificaron y se clonaron en un vector TOPO/pET101 según el protocolo del fabricante (kit de expresión Champion™ pET Directional TOPO®; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Las células TOP10 de *E. coli* [F⁻ mcrA D(mrr-hsdRMSmcrBC) (F80lacZDM15) DlacX74 recA1 deoR araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG] (Invitrogen) se transformaron con la mezcla de construcciones y se separaron sobre placas de agar. Los clones individuales recombinantes así obtenidos se cultivaron por separado, se aisló el ADN de plásmido, se identificó mediante determinación de tamaño o mapeo de restricción y se usó como molde para la amplificación por PCR de secuencias de PLE. Las secuencias amplificadas se secuenciaron a continuación (MWG-Biotech, Martinsried, Alemania).

25 Construcción del sistema de expresión

Se digirió ADN de plásmido de las construcciones TOPO/pET101-PLE individuales con NdeI y XhoI según el protocolo del fabricante (New England Biolabs, Beverly, MA, EE.UU.; Promega, Madison, WI, EE.UU.) y los fragmentos de aproximadamente 1694 pb de tamaño respectivos se introdujeron en el vector pET15b purificado sobre gel de agarosa digerido con NdeI y XhoI (Novagen, Madison, WI, EE.UU.); éste añade al gen adicionalmente una cola de His del extremo N. Los productos de ligación se utilizaron para la transformación de cepas DH5 α de *E. coli* (Novagen, Madison, WI, EE.UU.) [supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 ti-1relA1] y el plásmido se multiplicó mediante cultivo de las cepas transformadas. El plásmido se aisló de las cepas recombinantes y se secuenció de nuevo para el control. Las construcciones pET15b-PLE así obtenidas se usaron para la transformación de cepas Origami (DE 3) de *E. coli* [Δ (ara-leu)7697 Δ lacX74 Δ phoA Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F⁺[lac⁺ lacI^q pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB (Kan^R, Str^R, Tet^R)⁴] (Novagen, Madison, WI, EE.UU.), que se habían transformado previamente con el plásmido pGro7 (Chaperone Plasmid Set, TAKARA BIO Inc., Otsu, Shiga, Japón), que hace posible la expresión de la chaperona GroEL+GroES.

40 Detalles para la expresión de la esterasa de hígado de cerdo en coexpresión del complejo de chaperona GroEL/ES: Böttcher, D., Brüsehaber, E., Doderer, K., Bornscheuer, U.T. (2007), Functional expression of the gamma-isoenzyme of pig liver carboxyl esterase in Escherichia coli, Appl. Microbiol. Biotechnol., (2007), 73(6), 1282-1289.

Expresión de la isoenzima de PLE recombinante en Origami de *E. coli* bajo la coexpresión del complejo de chaperona GroEL/ES

45 La coexpresión de las chaperonas con las isoenzimas PLE se realizó en 150 ml de medio LB que contenía 20 μ g ml⁻¹ de cloranfenicol y 50 μ g ml⁻¹ de ampicilina para la selección de plásmidos. La expresión de chaperonas se inició inmediatamente mediante la adición de 1 mg ml⁻¹ de L-arabinosa. A un valor de DO₆₀₀ de 0,5, la producción de PLE se indujo mediante la adición de IPTG 40 μ M. Después de 24 h, las células se separaron por centrifugación, se resuspendieron en 10 ml de tampón fosfato de sodio (50 mM, pH 7,5) y se digirieron con ultrasonidos. El sobrenadante después de la separación por centrifugación de los fragmentos celulares se utilizó para posteriores experimentos (extracto en bruto de células). El contenido de proteínas y la actividad de esterasa se determinaron según Bradford o con el ensayo pNPA.

Electroforesis en gel de poliacrilamida nativa y tinción de la actividad con Fast Red

55 Una mezcla que contiene el extracto en bruto de la PLE recombinantemente preparada (5-15 μ l, correspondientemente a 0,05-0,15 U del análisis de pNPA) se mezcló con disolución tampón (20% (p/v) de glicerina; 0,0025% (p/v) de azul de bromofenol en dH₂O) (5-10 μ l). Alícuotas de la misma se separaron en un gel de poliacrilamida nativa (7,5%). Para la tinción de la actividad, el gel se incubó en una mezcla de acetato de α -naftilo recientemente preparada y Fast Red. La

formación de un complejo rojo entre el α -naftol generado y Fast Red mostró la actividad hidrolítica de la esterasa (Krebsfänger, N. y col., (1998) *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 641 - 646). A continuación, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie.

Actividad de esterasa

- 5 La actividad de esterasa se determinó espectrofotométricamente en tampón fosfato de sodio (50 mM) mediante acetato de p-nitrofenilo (10 mM disuelto en sulfóxido de dimetilo) como sustrato. La cantidad de p-nitrofenol generado se determinó a una longitud de onda de 410 nm ($\epsilon = 15 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a TA y pH 7,5. 1 unidad (U) se define como la cantidad de enzima que es capaz de convertir 1 μM de p-nitrofenol por minuto bajo condiciones de análisis (Krebsfänger, N., y col., (1998) *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 641 -646).
- 10 La especificidad por sustrato de la esterasa se analizó a valor de pH constante. Una cantidad conocida de esterasa se añadió a una emulsión (20 ml) que contiene un sustrato de éster (5% (v/v); tributirina, acetato de etilo, trioleína o butirato de metilo) y goma arábiga (2% (p/v)) a 37 °C. El ácido liberado se retrovaloró automáticamente en un pH-Stationer (Schott, Mainz, Alemania) con NaOH 0,01 N para mantener un valor de pH constante de 7,5. 1 unidad (U) se define como la cantidad de enzima que es capaz de generar 1 μM de ácido por minuto bajo condiciones de análisis.
- 15 Estereoselectividad de la hidrólisis enzimática de acetatos de alcoholes secundarios (véase el documento DE10258327A1)

La hidrólisis se realizó en recipientes de reacción de 1,5 ml en un Thermomixer (Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 37 °C. Para 1 ml de disolución de sustrato (10 mM en tampón fosfato de sodio a pH 7,5, 50 mM) se usaron 0,5 U de extracto en bruto de esterasa (referido a la prueba de pNPA). Para interrumpir la reacción, la mezcla se extrajo con diclorometano y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro.

- 20 La determinación de la pureza enantiomérica y la conversión se realiza por cromatografía de gases. La enantioselectividad de las variantes enzimáticas se calculó según Chen y col. (C.S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C.J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 7294).

- 25 Para una descripción detallada de la síntesis de los sustratos y de los tiempos de retención en la analítica por CG véase Musidowska-Persson, A. y Bornscheuer, U.T., "Substrate Specificity of the γ -isoenzyme of recombinant pig liver esterase towards acetates of secondary alcohols" *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 2002, 19-20, 129-133.

Estereoselectividad de la hidrólisis enzimática de cis-3,5-diacetoxiciclopent-1-eno

- El procedimiento experimental fue similar al de la resolución de racematos de alcoholes secundarios. Se utilizaron 0,5 unidades (pNPA) de extracto en bruto de PLE en 1 ml de mezcla de reacción con sustrato 10 mM en tampón fosfato de sodio a pH 7,5 50 mM. La reacción se realizó a 37 °C y en los momentos especificados se extrajeron muestras. El análisis de la conversión y de los excesos enantioméricos de producto se realizó por cromatografía de gases. Para el análisis se usó una columna de CG Hydrodex®-b-3P (heptaquis-(2,6-di-O-metil-3-O-pentil-b-ciclodextrina (25 m, 0,25 mm) (Machery Nagel, Düren, Alemania) en un aparato de CG C-R5A Chromatopac/Integrator (Shimadzu, Duisburg, Alemania). Los tiempos de retención en una separación con una temperatura de la columna de 110 °C ascendieron a: cis-3,5-diacetoxi-
- 30 ciclo-pent-1-eno: 21,8 min, 3(S)-acetoxi-5(R)-hidroxi-ciclopent-1-eno: 18,2 min, 3(R)-acetoxi-5(S)-hidroxi-ciclopent-1-eno: 16,0 min.

Resultados:

Aislamiento de ARNm de hígado de cerdo y RT-PCR

- La calidad del ARN aislado se comprobó en un gel de agarosa (figura no mostrada) y se realizó una cuantificación espectrofotométrica (2,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); pudieron así obtenerse 260 μg de ARN a partir de 0,1 g de tejido utilizado. Después de la transcripción en ADNc mediante RT-PCR, la calidad del ADNc se comprobó utilizándolo como molde para la amplificación del gen de mantenimiento β -actina. En la Fig. 1 puede apreciarse que el ADNc permitió la amplificación del gen β -actina y su calidad es, por tanto, adecuada para otros experimentos.

- 45 Fig. 1: Control de calidad de ADNc mediante amplificación del gen para β -actina. Molde: Carril 1: ADNc humano (control pos.), Carril 2: ADNc de hígado de cerdo, Carril 3: agua (control neg.).

Amplificación y clonación de genes PLE

- El ADNc se utilizó para la amplificación de genes PLE con cebadores que se basaban en la secuencia de γ PLE. Como puede apreciarse en la Fig. 2, la aplicación de la mezcla de reacción después de la PCR sobre un gel de agarosa proporciona una banda nítida a aproximadamente 1,7 kpb, lo que se corresponde con el tamaño de γ PLE. Estas bandas se cortaron, se aisló el ADN y se clonó en un vector TOPO con ayuda del nucleótido protuberante CACC unido por el

cebador. Después de la transformación de células Top10 de *E. coli* con esta mezcla de construcciones se obtuvieron clones recombinantes. El ADN de plásmido de estos clones se aisló, se controló con un mapeo de restricción y se secuenció.

5 Fig. 2: Amplificación de genes PLE a partir de ADNc de hígado de cerdo. Carril 1: ADNc como molde, Carril 2: marcador de 1 kpb, Carril 3: agua como molde (control neg.).

Resultados de la secuenciación

La secuenciación de los nuevos genes PLE mostró que se obtuvieron cuatro nuevas secuencias de genes distintas entre sí y distintas de γ -PLE. Los sitios que se desvían de la secuencia de γ -PLE se representan en alineamiento de secuencias de aminoácidos en la Fig. 3. Las PLE o sus genes así presentes se numeraron de 1 a 5, correspondiéndose PLE 1 con la γ -PLE ya conocida. Las desviaciones de las nuevas PLE en comparación con la γ -PLE conocida pueden resumirse del siguiente modo:

PLE 2: 6 sustituciones de nucleótidos (3 sustituciones de aminoácidos) [isoenzima 4]

PLE 3: 35 sustituciones de nucleótidos (20 sustituciones de aminoácidos) [isoenzima 24]

PLE 4: 34 sustituciones de nucleótidos (20 sustituciones de aminoácidos) [isoenzima 39]

15 PLE 5: 34 sustituciones de nucleótidos (21 sustituciones de aminoácidos) [isoenzima 41]

Fig. 3: Alineamiento parcial de las secuencias de aminoácidos de las PLE 2, 3, 4 y 5 encontradas con la secuencia de γ -PLE (PLE 1).

Expresión de las proteínas

20 Los cinco genes encontrados se subclonaron en un vector pET15b. Origami de *E. coli* se transformó con estas construcciones y con el plásmido pGro7 que codifica las dos partes de chaperonas GroES y GroEL. Para este sistema de expresión, en el documento (DE 10061864) se describió la sobre-expresión de PLE en *E. coli*. Las cepas se cultivaron a pequeña escala (50 ml / 150 ml) y se indujo la expresión de proteínas de chaperona y la construcción de PLE. Adicionalmente, la γ PLE y Origami de *E. coli* con pGro7 sin el vector pET se cocultivaron como comparación y se indujo la expresión de proteínas. Los sobrenadantes se digirieron (3 ml / 9 ml de volumen) y los extractos en bruto se obtuvieron con las proteínas intracelulares solubles mediante separación por centrifugación, que se utilizaron para los siguientes experimentos.

El contenido de proteínas ascendió en todos los extractos en bruto a aproximadamente 7 - 9 mg/ml (de los que una gran parte de la proteína formada se corresponde a las chaperonas); el volumen final del extracto en bruto fue de 3 ó 9 ml dependiendo del tamaño del cultivo.

30 Gel nativo y tinción con Fast Red

Para el control de la actividad de esterasa, los extractos en bruto se aplicaron sobre un gel nativo que a continuación se incubó en disolución de Fast Red con acetato de α -naftilo como sustrato. A continuación se realizó una tinción con Coomassie (Fig. 4: PAGE nativa de los extractos en bruto de PLE2, clon 12, PLE3, PLE4, PLE5, γ PLE y Origami pGro7 natural de *E. coli* (control neg.). Izquierda: Tinción con Fast Red con acetato de α -naftilo, derecha: Posterior tinción con azul brillante de Coomassie).

En PLE2, PLE3, PLE4, PLE5 y γ PLE se aprecian las bandas de esterasa activas que raramente presentan diferentes tamaños y están muy fuertemente corridas. Como los geles nativos no corren tan limpiamente como los genes de SDS desnaturalizantes, esto puede atribuirse al procedimiento; pero también es posible que en algunos extractos en bruto estén presentes construcciones de PLE tanto trímeras como también tetrámeras, siendo ambas activas.

40 El clon 12 no muestra actividad. En el extracto en bruto de Origami de *E. coli* sin la construcción pET15b tampoco es detectable actividad de esterasa como era de esperar.

Mediante las bandas de proteínas en la tinción con Coomassie puede apreciarse claramente que, además de γ PLE, se sobre-expresó mucha chaperona. Los contenidos de proteína determinados por Bradford también comprenden sobre todo la chaperona y no dan ninguna información sobre el contenido de γ PLE. Mediante la tinción con Coomassie realizada después de Fast Red ya no puede facilitarse información precisa sobre la intensidad de la sobre-expresión. En comparación con el tipo natural de *E. coli* con chaperona no se aprecian bandas de proteína adicionales en la región de las bandas activas. Pero frecuentemente se produce que la proteína ya no puede teñirse más con Coomassie después de la tinción de actividad. Pero también podría significar que la expresión en exceso solo es muy baja y a pesar de esto proporciona proteína con buena actividad.

50

Actividad en comparación con acetato de p-nitrofenilo

Para comprobar la actividad de esterasa, inicialmente se usó el ensayo pNPA. Proporcionó los resultados citados en la Tabla 1.

5 **Tab. 1.** Actividades en volumen (U/ml) de variantes de PLE y de cepa de expresión (Origami de *E. coli* con plásmido de chaperona pGro7) en comparación con pNPA. Todas las esterasas llevan en el extremo N una cola de His6.

Extracto en bruto	Actividad en volumen (U/ml)
PLE 1 (γ -PLE)	11
PLE 2	8
PLE 3	21
PLE 4	26
PLE 5	40
Origami de <i>E. coli</i> + pGro7	0,02

En todas las PLE se aprecia una actividad en comparación con pNPA, en algunas de las nuevas esterasas incluso de dos a cuatro veces mayor que en la de γ -PLE.

Actividad en comparación con ésteres aquirales

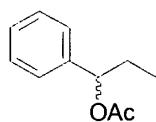
10 La investigación de la actividad de las nuevas variantes de PLE en comparación con ésteres aquirales se realizó con pH-Stat. Después de la purificación de las enzimas se determinaron actividades específicas que se recogen en la Tabla 2.

Tab. 2. Actividades específicas de las nuevas PLE y de γ -PLE en comparación con algunos ésteres aquirales, determinadas con pH-Stat a 37°C y pH 7,5 durante un tiempo de medición de 10 min.

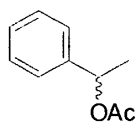
	Tributirina	Caprilato de etilo	Butirato de metilo	Acetato de etilo	Trioleína
PLE 1 (γ -PLE)	306	63	57	38	0
PLE 3	224	63	23	24	8
PLE 4	131	44	76	25	9
PLE 5	409	144	182	17	12

15 Resolución de racematos de acetatos de alcoholes secundarios

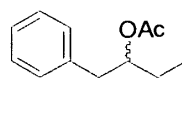
Se investigó la hidrólisis de los siguientes acetatos racémicos:



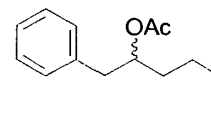
1
Acetato de (R,S)-1-
fenil-1-propilo



2
Acetato de (R,S)-1-
fenil-etilo



3
Acetato de (R,S)-1-
fenil-2-butilo



4
Acetato de (R,S)-1-
fenil-2-pentilo

20 Las investigaciones por cromatografía de gases proporcionaron los resultados mostrados en las Tab. 3 a 6. Como comparación se añadieron los valores de medición determinados por A. Musidowska (Musidowska-Persson, A. y Bornscheuer, U.T., J. Mol. Catal. B. Enzym. 2002, 19-20, 129-133) para los preparados de PLE comerciales.

Tab. 3. Enantioselectividad de las nuevas variantes de PLE en la resolución cinética de racematos de 1 acetato de (*R,S*)-1-fenil-1-propilo. (*) Los datos de medición para Fluka-PLE y Chirazyme E2 se tomaron de Musidłowska-Persson, A. y Bornscheuer, U.T., J. Mol. Catal. B. Enzym. 2002, 19-20, 129-133.

Isoenzima de PLE	Tiempo [h]	Exceso enantiomérico		Conversión [%]	E	Preferencia
		[% ee _S]	[% ee _P]			
PLE 1 (γ -PLE)	4	41	45	48	4	R
PLE 2	2	38	49	44	4	R
PLE 3	1	25	34	43	3	S
PLE 4	1,5	51	71	42	10	R
PLE 5	1	61	93	40	51	R
Fluka-PLE (*)	1	21	28	43	2,2	R
Chirazyme E2 (*)	0,5	18	27	40	2,1	R

5

Tab. 4. Enantioselectividad de las nuevas variantes de PLE en la resolución cinética de racematos de 2 acetato de (*R,S*)-1-fenil-etilo. (*) Los datos de medición para Fluka-PLE y Chirazyme E2 se tomaron de Musidłowska-Persson, A. y Bornscheuer, U.T., J. Mol. Catal. B. Enzym. 2002, 19-20, 129-133.

Isoenzima de PLE	Tiempo [h]	Exceso enantiomérico		Conversión [%]	E	Preferencia
		[% ee _S]	[% ee _P]			
PLE 1 (γ -PLE)	2	74	77	49	17	R
PLE 2	2	67	81	45	19	R
PLE 3	1,5	18	24	43	2	S
PLE 4	3	68	94	42	66	R
PLE 5	2	79	95	45	94	R
Fluka-PLE (*)	1,5	65	56	54	7	R
Chirazyme E2 (*)	1	61	56	52	7	R

10

Tab. 5. Enantioselectividad de las nuevas variantes de PLE en la resolución cinética de racematos de 3 acetato de (*R,S*)-1-fenil-2-butilo. (*) Los datos de medición para Fluka-PLE y Chirazyme E2 se tomaron de Musidłowska-Persson, A. y Bornscheuer, U.T., J. Mol. Catal. B. Enzym. 2002, 19-20, 129-133.

Isoenzima de PLE	Tiempo [h]	Exceso enantiomérico		Conversión [%]	E	Preferencia
		[% ee _S]	[% ee _P]			
PLE 1 (γ -PLE)	4	83	93	47	72	S
PLE 2	4	67	93	42	55	S
PLE 3	4	26	32	45	2	R
PLE 4	3	65	83	43	25	R
PLE 5	4	82	89	48	45	R

Fluka-PLE (*)	2	12	12	49	1,4	S
Chirazyme E2 (*)	1	58	40	59	4	S

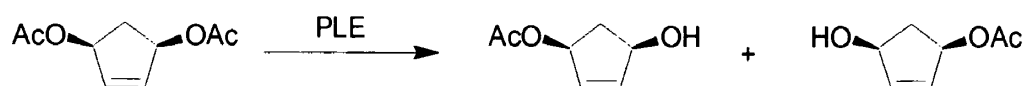
Tab. 6. Enantioselectividad de las nuevas variantes de PLE en la resolución cinética de racematos de 4 acetato de (*R,S*)-1-fenil-2-pentilo. (*) Los datos de medición para Fluka-PLE y Chirazyme E2 se tomaron de Musidowska-Persson, A. y Bornscheuer, U.T., J. Mol. Catal. B. Enzym. 2002, 19-20, 129-133.

Isoenzima de PLE	Tiempo [h]	Exceso enantiomérico		Conversión [%]	E	Preferencia
		[% ee _S]	[% ee _P]			
PLE 1 (γ -PLE) (*)	2	69	78	47	17	S
PLE 2	0,2	71	87	45	30	S
PLE 3	0,05	23	37	38	3	R
PLE 4	0,2	76	84	48	27	R
PLE 5	0,5	86	85	50	34	R
Fluka-PLE (*)	0,3	24	26	48	2,1	S
Chirazyme E2 (*)	0,3	21	24	46	2	S

5

En la Fig. 5 se ilustran de nuevo gráficamente las diferencias en los excesos enantioméricos.

Fig. 5. Enantioselectividades de distintas isozimas de esterasa de hígado de cerdo en la resolución de racematos cinética de los sustratos 1-4. Los valores para las PLE de Fluka comerciales se tomaron de la bibliografía (Musidowska-Persson, A. y Bornscheuer, U.T., J. Mol. Catal. B. Enzym. 2002, 19-20, 129-133).

10 Hidrólisis de *cis*-3,5-diacetoxiciclopent-1-eno

Tab. 7. Asimetrización de *meso-cis*-3,5-diacetoxiciclopent-1-eno por las nuevas variantes de PLE, γ -PLE (PLE 1) y la PLE de Fluka que puede obtenerse comercialmente. La reacción se realizó con 0,5 unidades (pNPA) de extracto en bruto a 37°C y los excesos enantioméricos se determinaron por cromatografía de gases.

15

Isoenzima de PLE	Tiempo [h]	Exceso enantiomérico [% ee _P]	Conversión [%]	Preferencia
PLE 1	14	82	96	6a (3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)
PLE 2	14	83	91	6a (3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)
PLE 3	14	83	99	6a (3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)
PLE 4	14	42	95	6b (3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)
PLE 5	14	17	100	6b (3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)
Fluka-PLE	20	61	100	6a (3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)

Las diferencias de las variantes de PLE en los excesos enantioméricos de producto se ilustran en la Fig. 6.

Fig. 6. Exceso enantiomérico de producto de distintas isozimas de esterasa de hígado de cerdo en la hidrólisis de *cis*-3,5-

diacetoxiciclopent-1-eno.

Influencia de inhibidores

5 Para la determinación de la capacidad inhibidora de las nuevas variantes de PLE, los extractos en bruto se mezclaron con cada uno de los tres inhibidores de esterasas. Se investigó la influencia de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, fluoruro de sodio y fisostigmina. Transcurrido un tiempo determinado se tomaron muestras y la actividad de esterasa restante se determinó con el ensayo pNPA. Los resultados se representan en la Tab. 8.

10 **Tab. 8.** Actividades restantes [%] de las nuevas isoenzimas de PLE después de la incubación con los tres inhibidores fluoruro de sodio, fluoruro de fenilmetilsulfonilo y fisostigmina a 25°C. Las actividades se determinaron con el ensayo pNPA.

Inhibidor	Conc.	Actividad residual en %				
		PLE 1 (γ -PLE)	PLE 2	PLE 3	PLE 4	PLE 5
NaF	1 mM					
5 min		20	17	44	64	83
30 min		21	15	46	66	88
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	0,01 mM					
1 min		97	87	77	78	88
5 min		85	82	51	56	76
30 min		55	50	7	7	24
60 min		46	36	5	2	3
Fisostigmina	0,01 mM					
1 min		41	61	83	90	94
5 min		12	25	81	82	98
30 min		7	6	72	66	75

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Degussa GmbH
- <120> Isoformas de PLE
- 5 <130> 200700099
- <160> 12
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 1698
- <212> ADN
- 15 <213> Hígado de cerdo
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1698)
- 20 <400> 1

atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg	48
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro	
1 5 10 15	
cgc ggc agc cat atg ggg cag cca gcc tcg ccg cct gtt gtg gac act	96
Arg Gly Ser His Met Gly Gln Pro Ala 25 Ser Pro Pro Val Val Asp Thr	
20 25 30	
gcc cag ggc cga gtc ctg ggg aag tac gtc agc tta gaa ggc ctg gca	144
Ala Gln Gly Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala	
35 40 45	
cag ccg gtg gcc gtc ttc ctg gga gtc cct ttt gcc aag ccc cct ctc	192
Gln Pro Val Ala Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu	
50 55 60	
gga tcc ttg agg ttt gct ccg ccg cag cct gca gaa cca tgg agc ttc	240
Gly Ser Leu Arg Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe	
65 70 75 80	
gtg aag aac acc acc tcc tac cct ccc atg tgc tgc cag gac cca gta	288
Val Lys Asn Thr Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val	
85 90 95	
gtg gag cag atg acc tca gat cta ttt acc aac gga aag gag agg ctc	336
Val Glu Gln Met Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu	
100 105 110	
act ctg gag ttt tct gaa gac tgt ctc tac cta aat att tac acc cct	384
Thr Leu Glu Phe Ser Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro	
115 120 125	
gct gac ctg aca aag agg ggc aga ctg ccg gtg atg gtg tgg atc cac	432
Ala Asp Leu Thr Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His	
130 135 140	
gga gga ggc ctg gtg ttg ggc ggg gca cca atg tat gat ggg gtg gtg	480
Gly Gly Gly Leu Val Leu Gly Gly Ala Pro Met Tyr Asp Gly Val Val	
145 150 155 160	
ctt gct gcg cat gaa aac gtg gtg gtg gtg gcc atc cag tac cgc ctg	528
Leu Ala Ala His Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu	
165 170 175	
ggc atc tgg gga ttc ttc agc aca ggg gat gaa cac agc cgg ggc aac	576
Gly Ile Trp Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn	

ES 2 428 070 T3

			180			185			190							
tgg	ggt	cac	ttg	gac	cag	gtg	gcc	gca	ctg	cac	tgg	gtc	cag	gag	aac	624
Trp	Gly	His	Leu	Asp	Gln	Val	Ala	Ala	Leu	His	Trp	Val	Gln	Glu	Asn	
		195					200					205				
atc	gcc	aac	ttt	gga	ggc	gac	cca	ggc	tct	gtg	acc	atc	ttt	gga	gag	672
Ile	Ala	Asn	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Ile	Phe	Gly	Glu	
	210					215					220					
tca	gca	gga	ggg	gaa	agt	gtc	tct	gtt	ctg	gtg	ttg	tct	ccc	ttg	gcc	720
Ser	Ala	Gly	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Pro	Leu	Ala	
	225				230					235					240	
aag	aac	ctc	ttc	cac	cgg	gcc	atc	tct	gag	agt	ggc	gtg	gcc	ctc	act	768
Lys	Asn	Leu	Phe	His	Arg	Ala	Ile	Ser	Glu	Ser	Gly	Val	Ala	Leu	Thr	
				245					250					255		
ggt	gcc	ctg	gtc	agg	aag	gac	atg	aag	gct	gca	gct	aag	caa	att	gct	816
Val	Ala	Leu	Val	Arg	Lys	Asp	Met	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Gln	Ile	Ala	
			260					265					270			
gtc	ctt	gct	ggg	tgt	aaa	acc	acc	tcg	gct	gtc	ttt	ggt	cac	tgc		864
Val	Leu	Ala	Gly	Cys	Lys	Thr	Thr	Ser	Ala	Val	Phe	Val	His	Cys		
		275					280				285					
ctg	cgc	cag	aag	tcg	gag	gac	gag	ctc	ttg	gac	tta	acg	ctg	aag	atg	912
Leu	Arg	Gln	Lys	Ser	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Asp	Leu	Thr	Leu	Lys	Met	
	290				295						300					
aaa	ttt	tta	act	ctt	gat	ttt	cat	gga	gac	caa	aga	gag	agc	cat	ccc	960
Lys	Phe	Leu	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Gly	Asp	Gln	Arg	Glu	Ser	His	Pro	
	305				310					315					320	
ttc	ctg	ccc	act	gtg	gtg	gat	gga	gtg	ctg	ctg	ccc	aag	atg	cct	gaa	1008
Phe	Leu	Pro	Thr	Val	Val	Asp	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Lys	Met	Pro	Glu	
				325					330					335		
gag	att	ctg	gct	gag	aag	gat	ttc	aac	act	gtc	ccc	tac	atc	gtg	gga	1056
Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Lys	Asp	Phe	Asn	Thr	Val	Pro	Tyr	Ile	Val	Gly	
			340					345					350			
atc	aac	aag	caa	gag	ttt	ggc	tgg	ctt	ctg	cca	acg	atg	atg	ggc	ttc	1104
Ile	Asn	Lys	Gln	Glu	Phe	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro	Thr	Met	Met	Gly	Phe	
		355					360					365				
ccc	ctc	tct	gaa	ggc	aag	ctg	gac	cag	aag	acg	gcc	acg	tca	ctc	ctg	1152
Pro	Leu	Ser	Glu	Gly	Lys	Leu	Asp	Gln	Lys	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	
		370				375					380					
tgg	aag	tcc	tac	ccc	atc	gct	aac	atc	cct	gag	gaa	ctg	act	cca	gtg	1200
Trp	Lys	Ser	Tyr	Pro	Ile	Ala	Asn	Ile	Pro	Glu	Glu	Leu	Thr	Pro	Val	
					390					395					400	
gcc	act	gac	aag	tat	ttg	ggg	ggg	aca	gac	gac	ccc	gtc	aaa	aag	aaa	1248
Ala	Thr	Asp	Lys	Tyr	Leu	Gly	Gly	Thr	Asp	Asp	Pro	Val	Lys	Lys	Lys	
				405					410				415			
gac	ctg	ttc	ctg	gac	ttg	atg	ggg	gat	gtg	gtg	ttt	ggt	gtc	cca	tct	1296
Asp	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Met	Gly	Asp	Val	Val	Phe	Gly	Val	Pro	Ser	
			420					425					430			
gtg	acg	gtg	gcc	cgt	caa	cac	aga	gat	gca	gga	gcc	ccc	acc	tac	atg	1344
Val	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	His	Arg	Asp	Ala	Gly	Ala	Pro	Thr	Tyr	Met	
		435					440					445				
tat	gag	ttt	cag	tat	cgc	cca	agc	ttc	tca	tcg	gac	aag	aaa	ccc	aag	1392
Tyr	Glu	Phe	Gln	Tyr	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Ser	Asp	Lys	Lys	Pro	Lys	
	450					455					460					

ES 2 428 070 T3

acg	gtg	atc	ggg	gac	cac	ggg	gat	gag	atc	ttc	tcc	gtc	ttt	ggt	ttt	1440
Thr	Val	Ile	Gly	Asp	His	Gly	Asp	Glu	Ile	Phe	Ser	Val	Phe	Gly	Phe	
465					470				475					480		
cca	ctg	tta	aaa	ggc	gat	gcc	cca	gaa	gag	gag	gtc	agt	ctc	agc	aag	1488
Pro	Leu	Leu	Lys	Gly	Asp	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	
				485					490					495		
acg	gtg	atg	aaa	ttc	tgg	gcc	aac	ttt	gct	cgc	agt	ggg	aac	ccc	aat	1536
Thr	Val	Met	Lys	Phe	Trp	Ala	Asn	Phe	Ala	Arg	Ser	Gly	Asn	Pro	Asn	
			500					505					510			
ggg	gag	ggg	ctg	ccc	cat	tgg	ccg	atg	tac	gac	cag	gaa	gaa	ggg	tac	1584
Gly	Glu	Gly	Leu	Pro	His	Trp	Pro	Met	Tyr	Asp	Gln	Glu	Glu	Gly	Tyr	
		515					520					525				
ctt	cag	atc	ggc	gtc	aac	acc	cag	gca	gcc	aag	agg	ctg	aaa	ggt	gaa	1632
Leu	Gln	Ile	Gly	Val	Asn	Thr	Gln	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Lys	Gly	Glu	
	530					535					540					
gaa	gtg	gcc	ttc	tgg	aac	gat	ctc	ctg	tcc	aag	gag	gca	gca	aag	aag	1680
Glu	Val	Ala	Phe	Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	
545					550					555					560	
cca	ccc	aag	ata	aag	tga											1698
Pro	Pro	Lys	Ile	Lys												
				565												

<210> 2

<211> 565

<212> PRT

5 <213> Hígado de cerdo

<400> 2

Met	Gly	Ser	Ser	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly	Leu	Val	Pro
1				5					10					15	
Arg	Gly	Ser	His	Met	Gly	Gln	Pro	Ala	Ser	Pro	Pro	Val	Val	Asp	Thr
			20					25					30		
Ala	Gln	Gly	Arg	Val	Leu	Gly	Lys	Tyr	Val	Ser	Leu	Glu	Gly	Leu	Ala
		35				40						45			
Gln	Pro	Val	Ala	Val	Phe	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Ala	Lys	Pro	Pro	Leu
	50				55					60					
Gly	Ser	Leu	Arg	Phe	Ala	Pro	Pro	Gln	Pro	Ala	Glu	Pro	Trp	Ser	Phe
65				70					75						80
Val	Lys	Asn	Thr	Thr	Ser	Tyr	Pro	Pro	Met	Cys	Cys	Gln	Asp	Pro	Val
			85						90					95	
Val	Glu	Gln	Met	Thr	Ser	Asp	Leu	Phe	Thr	Asn	Gly	Lys	Glu	Arg	Leu
			100					105					110		
Thr	Leu	Glu	Phe	Ser	Glu	Asp	Cys	Leu	Tyr	Leu	Asn	Ile	Tyr	Thr	Pro
		115					120					125			

ES 2 428 070 T3

Ala Asp Leu Thr Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Leu Gly Gly Ala Pro Met Tyr Asp Gly Val Val
145 150 155 160

Leu Ala Ala His Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu
165 170 175

Gly Ile Trp Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn
180 185 190

Trp Gly His Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn
195 200 205

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

Ser Ala Gly Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala
225 230 235 240

Lys Asn Leu Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255

Val Ala Leu Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala
260 265 270

Val Leu Ala Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys
275 280 285

Leu Arg Gln Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met
290 295 300

Lys Phe Leu Thr Leu Asp Phe His Gly Asp Gln Arg Glu Ser His Pro
305 310 315 320

Phe Leu Pro Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu
325 330 335

Glu Ile Leu Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly
340 345 350

Ile Asn Lys Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe
355 360 365

Pro Leu Ser Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu
370 375 380

Trp Lys Ser Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val
385 390 395 400

Ala Thr Asp Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys

ES 2 428 070 T3

405 410 415

Asp Leu Phe Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser
 420 425 430

Val Thr Val Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met
 435 440 445

Tyr Glu Phe Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys
 450 455 460

Thr Val Ile Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe
 465 470 475 480

Pro Leu Leu Lys Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys
 485 490 495

Thr Val Met Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn
 500 505 510

Gly Glu Gly Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr
 515 520 525

Leu Gln Ile Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu
 530 535 540

Glu Val Ala Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys
 545 550 555 560

Pro Pro Lys Ile Lys
 565

5 <210> 3
 <211> 1698
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Mutante de PLE

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1698)

15 <400> 3

atg ggc agc agc cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg	48
Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro	
1 5 10 15	
cgc ggc agc cat atg ggg cag cca gcc tcg ccg cct gtt gtg gac act	96
Arg Gly Ser His Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr	
20 25 30	
gcc cag ggc cga gtc ctg ggg aag tac gtc agc tta gaa ggc ctg gca	144
Ala Gln Gly Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala	
35 40 45	

ES 2 428 070 T3

cag Gln	ccg Pro	gtg Val	gcc Ala	gtc Val	ttc Phe	ctg Leu	gga Gly	gtc Val	cct Pro	ttt Phe	gcc Ala	aag Lys	ccc Pro	cct Pro	ctc Leu	192
50						55					60					
gga Gly	tcc Ser	ttg Leu	agg Arg	ttt Phe	gct Ala	ccg Pro	ccg Pro	cag Gln	cct Pro	gca Ala	gaa Glu	cca Pro	tgg Trp	agc Ser	ttc Phe	240
65					70					75					80	
gtg Val	aag Lys	aac Asn	acc Thr	acc Thr	tcc Ser	tac Tyr	cct Pro	ccc Pro	atg Met	tgc Cys	tgc Cys	cag Gln	gac Asp	cca Pro	gta Val	288
				85					90					95		
gtg Val	gag Glu	cag Gln	atg Met	acc Thr	tca Ser	gat Asp	cta Leu	ttt Phe	acc Thr	aac Asn	gga Gly	aag Lys	gag Glu	agg Arg	ctc Leu	336
			100					105					110			
act Thr	ctg Leu	gag Glu	ttt Phe	tct Ser	gaa Glu	gac Asp	tgt Cys	ctc Leu	tac Tyr	cta Leu	aat Asn	att Ile	tac Tyr	acc Thr	cct Pro	384
		115					120					125				
gct Ala	gac Asp	ctg Leu	aca Thr	aag Lys	agg Arg	ggc Gly	aga Arg	ctg Leu	ccg Pro	gtg Val	atg Met	gtg Val	tgg Trp	atc Ile	cac His	432
	130					135					140					
gga Gly	gga Gly	ggc Gly	ctg Leu	gtg Val	ttg Leu	ggc Gly	ggg Gly	gca Ala	cca Pro	atg Met	tat Tyr	gat Asp	ggg Gly	gtg Val	gtg Val	480
145					150					155					160	
ctt Leu	gct Ala	gcg Ala	cat His	gaa Glu	aac Asn	gtg Val	gtg Val	gtg Val	gtg Val	gcc Ala	atc Ile	cag Gln	tac Tyr	cgc Arg	ctg Leu	528
				165						170				175		
ggc Gly	atc Ile	tgg Trp	gga Gly	ttc Phe	ttc Phe	agc Ser	aca Thr	ggg Gly	gat Asp	gaa Glu	cac His	agc Ser	cgg Arg	ggc Gly	aac Asn	576
			180					185					190			
tgg Trp	ggt Gly	cac His	ttg Leu	gac Asp	cag Gln	gtg Val	gcc Ala	gca Ala	ctg Leu	cac His	tgg Trp	gtc Val	cag Gln	gag Glu	aac Asn	624
		195					200					205				
atc Ile	gcc Ala	aac Asn	ttt Phe	gga Gly	ggc Gly	gac Asp	cca Pro	ggc Gly	tct Ser	gtg Val	acc Thr	atc Ile	ttt Phe	gga Gly	gag Glu	672
	210					215					220					
tca Ser	gca Ala	gga Gly	ggg Gly	gaa Glu	agt Ser	gtc Val	tct Ser	gtt Val	ctg Leu	gtg Val	ttg Leu	tct Ser	ccc Pro	ttg Leu	gcc Ala	720
225					230						235				240	
aag Lys	aac Asn	ctc Leu	ttc Phe	cac His	cgg Arg	ggc Ala	atc Ile	tct Ser	gag Glu	agt Ser	ggc Gly	gtg Val	gcc Ala	ctc Leu	act Thr	768
				245					250					255		
gtt Val	gcc Ala	ctg Leu	gtc Val	agg Arg	aag Lys	gac Asp	atg Met	aag Lys	gct Ala	gca Ala	gct Ala	aag Lys	caa Gln	att Ile	gct Ala	816
			260					265					270			
gtc Val	ctt Leu	gct Ala	ggg Gly	tgt Cys	aaa Lys	acc Thr	acc Thr	acc Thr	tcg Ser	gct Ala	gtc Val	ttt Phe	gtt Val	cac His	tgc Cys	864
		275				280						285				
ctg Leu	cgc Arg	cag Gln	aag Lys	tcg Ser	gag Glu	gac Asp	gag Glu	ctc Leu	ttg Leu	gac Asp	tta Leu	acg Thr	ctg Leu	aag Lys	atg Met	912
	290					295					300					
aaa Lys	ttt Phe	tta Leu	act Thr	ctt Leu	gat Asp	ttt Phe	cat His	gga Gly	gac Asp	caa Gln	aga Arg	gag Glu	agc Ser	cat His	ccc Pro	960
305					310					315					320	
ttc Leu	ctg Leu	ccc Pro	act Thr	gtg Leu	gtg Leu	gat Asp	gga Gly	gtg Leu	ctg Leu	ctg Leu	ccc Pro	aag Lys	atg Met	cct Pro	gaa Glu	1008

ES 2 428 070 T3

Phe	Leu	Pro	Thr	Val	Val	Asp	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Lys	Met	Pro	Glu		
				325					330					335			
gag	att	ctg	gct	gag	aag	gat	ttc	aac	act	gtc	ccc	tac	atc	gtg	gga	1056	
Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Lys	Asp	Phe	Asn	Thr	Val	Pro	Tyr	Ile	Val	Gly		
			340					345					350				
atc	aac	aag	caa	gag	ttt	ggc	tgg	ctt	ctg	cca	acg	atg	atg	ggc	ttc	1104	
Ile	Asn	Lys	Gln	Glu	Phe	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro	Thr	Met	Met	Gly	Phe		
		355					360					365					
ccc	ctc	tct	gaa	ggc	aag	ctg	gac	cag	aag	acg	gcc	acg	tca	ctc	ctg	1152	
Pro	Leu	Ser	Glu	Gly	Lys	Leu	Asp	Gln	Lys	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu		
	370					375					380						
tgg	aag	tcc	tac	ccc	atc	gct	aac	atc	cct	gag	gaa	ctg	act	cca	gtg	1200	
Trp	Lys	Ser	Tyr	Pro	Ile	Ala	Asn	Ile	Pro	Glu	Glu	Leu	Thr	Pro	Val		
					390					395					400		
gcc	act	gac	aag	tat	ttg	ggg	ggg	aca	gac	gac	ccc	gtc	aaa	aag	aaa	1248	
Ala	Thr	Asp	Lys	Tyr	Leu	Gly	Gly	Thr	Asp	Asp	Pro	Val	Lys	Lys	Lys		
				405					410					415			
gac	ctg	ttc	ctg	gac	ttg	atg	ggg	gat	gtg	gtg	ttt	ggt	gtc	cca	tct	1296	
Asp	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Met	Gly	Asp	Val	Val	Phe	Gly	Val	Pro	Ser		
			420					425					430				
gtg	acg	gtg	gcc	cgt	caa	cac	aga	gat	gca	gga	gcc	ccc	acc	tac	atg	1344	
Val	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	His	Arg	Asp	Ala	Gly	Ala	Pro	Thr	Tyr	Met		
		435					440					445					
tat	gag	ttt	cag	tat	cgc	cca	agc	ttc	tca	tcg	gac	aag	aaa	ccc	aag	1392	
Tyr	Glu	Phe	Gln	Tyr	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Ser	Asp	Lys	Lys	Pro	Lys		
	450					455					460						
acg	gtg	atc	ggg	gac	cac	ggg	gat	gag	atc	ttc	tcc	gtc	ttt	ggg	gct	1440	
Thr	Val	Ile	Gly	Asp	His	Gly	Asp	Glu	Ile	Phe	Ser	Val	Phe	Gly	Ala		
				470					475					480			
cca	ttt	tta	aga	ggc	gat	gcc	cca	gaa	gag	gag	gtc	agt	ctc	agc	aag	1488	
Pro	Phe	Leu	Arg	Gly	Asp	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Val	Ser	Leu	Ser	Lys		
				485				490						495			
acg	gtg	atg	aaa	ttc	tgg	gcc	aac	ttt	gct	cgc	agt	ggg	aac	ccc	aat	1536	
Thr	Val	Met	Lys	Phe	Trp	Ala	Asn	Phe	Ala	Arg	Ser	Gly	Asn	Pro	Asn		
			500					505					510				
ggg	gag	ggg	ctg	ccc	cat	tgg	ccg	atg	tac	gac	cag	gaa	gaa	ggg	tac	1584	
Gly	Glu	Gly	Leu	Pro	His	Trp	Pro	Met	Tyr	Asp	Gln	Glu	Glu	Gly	Tyr		
		515					520					525					
ctt	cag	atc	ggc	gtc	aac	acc	cag	gca	gcc	aag	agg	ctg	aaa	ggt	gaa	1632	
Leu	Gln	Ile	Gly	Val	Asn	Thr	Gln	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Lys	Gly	Glu		
		530				535					540						
gaa	gtg	gcc	ttc	tgg	aac	gat	ctc	ctg	tcc	aag	gag	gca	gca	aag	aag	1680	
Glu	Val	Ala	Phe	Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys		
					550					555					560		
cca	ccc	aag	ata	aag	tga											1698	
Pro	Pro	Lys	Ile	Lys													
				565													

<210> 4

<211> 565

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 4

ES 2 428 070 T3

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr
20 25 30

Ala Gln Gly Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala
35 40 45

Gln Pro Val Ala Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu
50 55 60

Gly Ser Leu Arg Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe
65 70 75 80

Val Lys Asn Thr Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val
85 90 95

Val Glu Gln Met Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu
100 105 110

Thr Leu Glu Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro
115 120 125

Ala Asp Leu Thr Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Leu Gly Gly Ala Pro Met Tyr Asp Gly Val Val
145 150 155 160

Leu Ala Ala His Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu
165 170 175

Gly Ile Trp Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn
180 185 190

Trp Gly His Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn
195 200 205

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

Ser Ala Gly Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala
225 230 235 240

Lys Asn Leu Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255

ES 2 428 070 T3

Val Ala Leu Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala
 260 265 270

Val Leu Ala Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys
 275 280 285

Leu Arg Gln Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met
 290 295 300

Lys Phe Leu Thr Leu Asp Phe His Gly Asp Gln Arg Glu Ser His Pro
 305 310 315 320

Phe Leu Pro Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu
 325 330 335

Glu Ile Leu Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly
 340 345 350

Ile Asn Lys Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe
 355 360 365

Pro Leu Ser Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu
 370 375 380

Trp Lys Ser Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val
 385 390 395 400

Ala Thr Asp Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys
 405 410 415

Asp Leu Phe Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser
 420 425 430

Val Thr Val Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met
 435 440 445

Tyr Glu Phe Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys
 450 455 460

Thr Val Ile Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Ala
 465 470 475 480

Pro Phe Leu Arg Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys
 485 490 495

Thr Val Met Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn
 500 505 510

Gly Glu Gly Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr
 515 520 525

Leu Gln Ile Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu
 530 535 540

Glu Val Ala Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys
 545 550 555 560

Pro Pro Lys Ile Lys
 565

<210> 5
 <211> 1698
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Mutante de PLE

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1698)

10 <400> 5

atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg	48
Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro	
1 5 10 15	
cgc ggc agc cat atg ggg cag cca gcc tcg ccg cct gtt gtg gac act	96
Arg Gly Ser His Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr	
20 25 30	
gcc cag ggc cga gtc ctg ggg aag tac gtc agc tta gaa ggc ctg gca	144
Ala Gln Gly Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala	
35 40 45	
cag ccg gtg gcc gtc ttc ctg gga gtc cct ttt gcc aag ccc cct ctc	192
Gln Pro Val Ala Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu	
50 55 60	
gga tcc ttg agg ttt gct ccg ccg cag cct gca gaa cca tgg agc ttc	240
Gly Ser Leu Arg Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe	
65 70 75 80	
gtg aag aac acc acc tcc tac cct ccc atg tgc tgc cag gac cca gta	288
Val Lys Asn Thr Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val	
85 90 95	
gcg ggg cag atg acc tca gat cta ttt acc aac aga aag gag agg ctc	336
Ala Gly Gln Met Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu	
100 105 110	
att ccg gag ttt tct gaa gac tgt ctc tac cta aat att tac acc cct	384
Ile Pro Glu Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro	
115 120 125	
gct gac ctg aca aag agg gcc aga ctg ccg gtg atg gtg tgg atc cac	432
Ala Asp Leu Thr Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His	
130 135 140	
gga gga ggt ctg gtg gtg gcc ggg gct tcc acc tat gat gga ctg gcc	480
Gly Gly Gly Leu Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala	
145 150 155 160	
ctc gct gcg cat gaa aac gtg gtg gtg gtg gcc atc cag tac cgc ctg	528
Leu Ala Ala His Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu	
165 170 175	

ES 2 428 070 T3

ggc atc tgg gga ttc ttc agc aca ggg gac gaa cac agc cgg ggc aac Gly Ile Trp Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn 180 185 190	576
tgg ggt cac ttg gac cag gtg gcc gca ctg cac tgg gtc cag gag aac Trp Gly His 195 Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp 205 Val Gln Glu Asn	624
atc gcc aac ttt gga ggc gac cca ggc tct gtg acc atc ttt gga gag Ile Ala Asn Phe Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu 210 215 220	672
tca gca gga ggg gaa agt gtc tct gtt ctg gtg ttg tct ccc ttg gcc Ser Ala Gly Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala 225 230 235	720
aag aac ctc ttc cac cgg gcc atc tct gag agt ggc gtg gcc ttc act Lys Asn Leu Phe His Arg Ala Ile Ser 250 Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr 245 255	768
gct ggc ctg gtc agg aag gac atg aag gct gca gct aag caa att gct Ala Gly Leu Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala 260 265 270	816
gtc ctt gct ggg tgt aaa acc acc acc tcg gct gtc ttt gtt cac tgc Val Leu 275 Gly Cys Lys Thr 280 Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys 285	864
ctg cgc cag aag tcg gag gac gag ctc ttg gac tta acg ctg aag atg Leu Arg Gln Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met 290 295 300	912
aaa cct tta act ctt gat ttg cat gga gac ccc aga gag agc cat ccc Lys Pro Leu Thr Leu Asp 310 Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro 305 315 320	960
ttc ctg acc act gtg gtg gat gga gtg ctg ctg ccc aag atg cct gaa Phe Leu Thr Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu 325 330 335	1008
gag att ctg gct gaa aag gat ttc aac act gtc ccc tac atc gtg gga Glu Ile Leu Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly 340 345 350	1056
atc aac aag caa gag ttt ggc tgg ctt ctg cca acg atg atg ggc ttc Ile Asn Lys Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe 355 360 365	1104
ccc ctc tct gaa ggc aag ctg gac cag aag acg gcc acg tca ctc ctg Pro Leu Ser Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu 370 375 380	1152
tgg aag tcc tac ccc atc gct aac atc cct gag gaa ctg act cca gtg Trp Lys Ser Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val 385 390 400	1200
gcc act gac aag tat ttg ggg ggg aca gac gac ccc gtc aaa aag aaa Ala Thr Asp Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys 405 410 415	1248
gac ctg ttc ctg gac ttg atg ggg gat gtg gtg ttt ggt gtc cca tct Asp Leu Phe Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser 420 425 430	1296
gtg acg gtg gcc cgt caa cac aga gat gca gga gcc ccc acc tac atg Val Thr Val Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met 435 440 445	1344
tat gag ttt cag tat cgc cca agc ttc tca tcg gac aag aaa ccc aag	1392

ES 2 428 070 T3

Tyr Glu Phe Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys
 450 455 460
 acg gtg atc ggg gac cac ggg gat gag atc ttc tcc gtc ttt ggg gct 1440
 Thr Val Ile Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Ala
 465 470 475 480
 cca ttt tta aga ggc gat gcc cca gaa gag gag gtc agt ctc agc aag 1488
 Pro Phe Leu Arg Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys
 485 490 495
 acg gtg atg aaa ttc tgg gcc aac ttt gct cgc agt ggg aac ccc aat 1536
 Thr Val Met Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn
 500 505 510
 ggg gag ggg ctg ccc cat tgg ccg atg tac gac cag gaa gaa ggg tac 1584
 Gly Glu Gly Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr
 515 520 525
 ctt cag atc ggc gtc aac acc cag gca gcc aag agg ctg aaa ggt gaa 1632
 Leu Gln Ile Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu
 530 535 540
 gaa gtg gcc ttc tgg aac gat ctc ctg tcc aag gag gca gca aag aag 1680
 Glu Val Ala Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys
 545 550 555 560
 cca ccc aag ata aag tga 1698
 Pro Pro Lys Ile Lys 565

<210> 6
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 6

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10
 Arg Gly Ser His Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr
 20 25 30
 Ala Gln Gly Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala
 35 40 45
 Gln Pro Val Ala Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu
 50 55 60
 Gly Ser Leu Arg Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe
 65 70 75 80
 Val Lys Asn Thr Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val
 85 90 95
 Ala Gly Gln Met Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu
 100 105 110

ES 2 428 070 T3

Ile Pro Glu Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro
 115 120 125

Ala Asp Leu Thr Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His
 130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala
 145 150 155 160

Leu Ala Ala His Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu
 165 170 175

Gly Ile Trp Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn
 180 185 190

Trp Gly His Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn
 195 200 205

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

Ser Ala Gly Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala
 225 230 235 240

Lys Asn Leu Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr
 245 250 255

Ala Gly Leu Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala
 260 265 270

Val Leu Ala Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys
 275 280 285

Leu Arg Gln Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met
 290 295 300

Lys Pro Leu Thr Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro
 305 310 315 320

Phe Leu Thr Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu
 325 330 335

Glu Ile Leu Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly
 340 345 350

Ile Asn Lys Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe
 355 360 365

Pro Leu Ser Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu
 370 375 380

ES 2 428 070 T3

Trp Lys Ser Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val
 385 390 395 400
 Ala Thr Asp Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys
 405 410 415
 Asp Leu Phe Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser
 420 425 430
 Val Thr Val Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met
 435 440 445
 Tyr Glu Phe Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys
 450 455 460
 Thr Val Ile Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Ala
 465 470 475 480
 Pro Phe Leu Arg Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys
 485 490 495
 Thr Val Met Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn
 500 505 510
 Gly Glu Gly Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr
 515 520 525
 Leu Gln Ile Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu
 530 535 540
 Glu Val Ala Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys
 545 550 555 560
 Pro Pro Lys Ile Lys
 565

<210> 7
 <211> 1698
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Mutante de PLE

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1698)

<400> 7

atg ggc agc agc cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg	48
Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro	
1 5 10 15	
cgc ggc agc cat atg ggg cag cca gcc tcg ccg cct gtt gtg gac act	96
Arg Gly Ser His Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr	
20 25 30	

ES 2 428 070 T3

gcc Ala	cag Gln	ggc Gly 35	cga Arg	gtc Val	ctg Leu	ggg Gly	aag Lys 40	tac Tyr	gtc Val	agc Ser	tta Leu	gaa Glu 45	ggc Gly	ctg Leu	gca Ala	144
cag Gln	ccg Pro 50	gtg Val	ggc Ala	gtc Val	ttc Phe	ctg Leu 55	gga Gly	gtc Val	cct Pro	ttt Phe	gcc Ala 60	aag Lys	ccc Pro	cct Pro	ctc Leu	192
gga Gly 65	tcc Ser	ttg Leu	agg Arg	ttt Phe	gct Ala 70	ccg Pro	ccg Pro	cag Gln	cct Pro	gca Ala 75	gaa Glu	cca Pro	tgg Trp	agc Ser	ttc Phe 80	240
gtg Val	aag Lys	aac Asn	acc Thr	acc Thr 85	tcc Ser	tac Tyr	cct Pro	ccc Pro	atg Met 90	tgc Cys	tgc Cys	cag Gln	gac Asp	cca Pro 95	gta Val	288
gcg Ala	ggg Gly	cag Gln	atg Met 100	acc Thr	tca Ser	gat Asp	cta Leu	ttt Phe 105	acc Thr	aac Asn	aga Arg	aag Lys	gag Glu 110	agg Arg	ctc Leu	336
att Ile	ccg Pro	gag Glu 115	ttt Phe	tct Ser	gaa Glu	gac Asp	tgt Cys 120	ctc Leu	tac Tyr	cta Leu	aat Asn	att Ile 125	tac Tyr	acc Thr	cct Pro	384
gct Ala	gac Asp 130	ctg Leu	aca Thr	aag Lys	agg Arg	ggc Gly 135	aga Arg	ctg Leu	ccg Pro	gtg Val	atg Met 140	gtg Val	tgg Trp	atc Ile	cac His	432
gga Gly 145	gga Gly	ggt Gly	ctg Leu	gtg Val 150	gtg Val	ggc Gly	ggg Gly	gct Ala	tcc Ser	acc Thr 155	tat Tyr	gat Asp	gga Gly	ctg Leu	gcc Ala 160	480
ctc Leu	gct Ala	gcg Ala	cat His	gaa Glu 165	aac Asn	gtg Val	gtg Val	gtg Val	gtg Val 170	gcc Ala	atc Ile	cag Gln	tac Tyr	cgc Arg 175	ctg Leu	528
ggc Gly	atc Ile	tgg Trp	gga Gly 180	ttc Phe	ttc Phe	agc Ser	aca Thr	ggg Gly 185	gac Asp	gaa Glu	cac His	agc Ser	cgg Arg 190	ggc Gly	aac Asn	576
tgg Trp	ggt Gly	cac His 195	ttg Leu	gac Asp	cag Gln	gtg Val	gcc Ala 200	gca Ala	ctg Leu	cac His	tgg Trp	gtc Val 205	cag Gln	gag Glu	aac Asn	624
atc Ile	gcc Ala 210	aac Asn	ttt Phe	gga Gly	ggc Gly	gac Asp 215	cca Pro	ggc Gly	tct Ser	gtg Val	acc Thr 220	atc Ile	ttt Phe	gga Gly	gag Glu	672
tca Ser 225	gca Ala	gga Gly	ggg Gly	gaa Glu 230	agt Ser	gtc Val	tct Ser	gtt Val	ctg Leu 235	gtg Val	ttg Leu	tct Ser	ccc Pro	ttg Leu	gcc Ala 240	720
aag Lys	aac Asn	ctc Leu	ttc Phe	cac His 245	cgg Arg	gcc Ala	atc Ile	tct Ser	gag Glu 250	agt Ser	ggc Gly	gtg Val	gcc Ala	ttc Phe 255	act Thr	768
gct Ala	ggc Gly	ctg Leu	gtc Val 260	agg Arg	aag Lys	gac Asp	atg Met	aag Lys 265	gct Ala	gca Ala	gct Ala	aag Lys	caa Gln 270	att Ile	gct Ala	816
gtc Val	ctt Leu	gct Ala 275	ggg Gly	tgt Cys	aaa Lys	acc Thr	acc Thr 280	acc Thr	tcg Ser	gct Ala	gtc Val	ttt Phe 285	ggt Val	cac His	tgc Cys	864
ctg Leu	cgc Arg	cag Gln	aag Lys	tcg Ser	gag Glu	gac Asp 295	gag Glu	ctc Leu	ttg Leu	gac Asp	tta Leu 300	acg Thr	ctg Leu	aag Lys	atg Met	912

ES 2 428 070 T3

aaa ttt ttc gct ctt gat ttg cat gga gac ccc aga gag agc cat ccc 960
 Lys Phe Phe Ala Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro
 305 310 315 320
 ttc ctg acc act gtg gtg gat gga gtg ctg ctg ccc aag atg cct gaa 1008
 Phe Leu Thr Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu
 325 330 335
 gag att ctg gct gaa aag gat ttc aac act gtc ccc tac atc gtg gga 1056
 Glu Ile Leu Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly
 340 345 350
 atc aac aag caa gag ttt ggc tgg ctt ctg cca acg atg atg ggc ttc 1104
 Ile Asn Lys Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe
 355 360
 ccc ctc tct gaa ggc aag ctg gac cag aag acg gcc acg tca ctc ctg 1152
 Pro Leu Ser Glu Gly Lys Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu
 370 375 380
 tgg aag tcc tac ccc atc gct aac atc cct gag gaa ctg act cca gtg 1200
 Trp Lys Ser Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val
 385 390 400
 gcc act gac aag tat ttg ggg ggg aca gac gac ccc gtc aaa aag aaa 1248
 Ala Thr Asp Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys
 405 410 415
 gac ctg ttc ctg gac ttg atg ggg gat gtg gtg ttt ggt gtc cca tct 1296
 Asp Leu Phe Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser
 420 425 430
 gtg acg gtg gcc cgt caa cac aga gat gca gga gcc ccc acc tac atg 1344
 Val Thr Val Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met
 435 440 445
 tat gag ttt cag tat cgc cca agc ttc tca tcg gac aag aaa ccc aag 1392
 Tyr Glu Phe Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys
 450 455 460
 acg gtg atc ggg gac cac ggg gat gag atc ttc tcc gtc ttt ggg gct 1440
 Thr Val Ile Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Ala
 465 470 475 480
 cca ttt tta aga ggc gat gcc cca gaa gag gag gtc agt ctc agc aag 1488
 Pro Phe Leu Arg Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys
 485 490 495
 acg gtg atg aaa ttc tgg gcc aac ttt gct cgc agt ggg aac ccc aat 1536
 Thr Val Met Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn
 500 505 510
 ggg gag ggg ctg ccc cat tgg ccg atg tac gac cag gaa gaa ggg tac 1584
 Gly Glu Gly Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr
 515 520 525
 ctt cag atc ggc gtc aac acc cag gca gcc aag agg ctg aaa ggt gaa 1632
 Leu Gln Ile Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu
 530 535 540
 gaa gtg gcc ttc tgg aac gat ctc ctg tcc aag gag gca gca aag aag 1680
 Glu Val Ala Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys
 545 550 555 560
 cca ccc aag ata aag tga 1698
 Pro Pro Lys Ile Lys 565

<210> 8

<211> 565

<212> PRT

5

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 8

ES 2 428 070 T3

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr
20 25 30

Ala Gln Gly Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala
35 40 45

Gln Pro Val Ala Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu
50 55 60

Gly Ser Leu Arg Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe
65 70 75 80

Val Lys Asn Thr Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val
85 90 95

Ala Gly Gln Met Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu
100 105 110

Ile Pro Glu Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro
115 120 125

Ala Asp Leu Thr Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala
145 150 155 160

Leu Ala Ala His Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu
165 170 175

Gly Ile Trp Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn
180 185 190

Trp Gly His Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn
195 200 205

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

Ser Ala Gly Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala
225 230 235 240

ES 2 428 070 T3

Lys Asn Leu Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr
 245 250 255
 Ala Gly Leu Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala
 260 265
 Val Leu Ala Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys
 275 280 285
 Leu Arg Gln Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met
 290 295 300
 Lys Phe Phe Ala Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro
 305 310 315
 Phe Leu Thr Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu
 325 330 335
 Glu Ile Leu Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly
 340 345 350
 Ile Asn Lys Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe
 355 360 365
 Pro Leu Ser Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu
 370 375 380
 Trp Lys Ser Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val
 385 390 395 400
 Ala Thr Asp Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys
 405 410 415
 Asp Leu Phe Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser
 420 425 430
 Val Thr Val Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met
 435 440 445
 Tyr Glu Phe Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys
 450 455 460
 Thr Val Ile Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Ala
 465 470 475 480
 Pro Phe Leu Arg Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys
 485 490 495
 Thr Val Met Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn
 500 505 510
 Gly Glu Gly Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr
 515 520 525
 Leu Gln Ile Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu
 530 535 540
 Glu Val Ala Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys
 545 550 555 560
 Pro Pro Lys Ile Lys
 565

<210> 9
 <211> 1698
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Mutante de PLE

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1698)

<400> 9

atg ggc agc agc cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro 1 5 10 15	48
cgc ggc agc cat atg ggg cag cca gcc tcg ccg cct gtt gtg gac act Arg Gly Ser 20 Met Gly Gln Pro 25 Ser Pro Pro Val 30 Asp Thr	96
gcc cag ggc cga gtc ctg ggg aag tac gtc agc tta gaa ggc ctg gca Ala Gln Gly Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala 35 40 45	144
cag ccg gtg gcc gtc ttc ctg gga gtc cct ttt gcc aag ccc cct ctc Gln Pro Val Ala Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu 50 55 60	192
gga tcc ttg agg ttt gct ccg ccg cag cct gca gaa cca tgg agc ttc Gly Ser Leu Arg Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe 65 70 75 80	240
gtg aag aac acc acc tcc tac cct ccc atg tgc tgc caa gag cca att Val Lys Asn Thr Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile 85 90 95	288
ggg gga cag atg ctc tca gat cta ttt acc aac aga aag gag agg ctc Gly Gly Gln Met Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu 100 105 110	336
att ccg gag ttt tct gaa gac tgt ctc tac cta aat att tac acc cct Ile Pro Glu Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro 115 120 125	384
gct gac ctg aca aag agg ggc aga ctg ccg gtg atg gtg tgg atc cac Ala Asp Leu Thr Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His 130 135 140	432
gga gga ggt ctg gtg gtg ggc ggg gct tcc acc tat gat gga ctg gcc Gly Gly Gly Leu Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala 145 150 155 160	480

10

ES 2 428 070 T3

ctc gct gcg cat gaa aac gtg gtg gtg gtc gcc atc cag tac cgc ctg 528
 Leu Ala Ala His Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu
 165 170 175

ggc atc tgg gga ttc ttc agc aca ggg gac gaa cac agc cgg ggc aac 576
 Gly Ile Trp Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn
 180 185 190

tgg ggt cac ttg gac cag gtg gcc gca ctg cac tgg gtc cag gag aac 624
 Trp Gly His Leu Asp Gln Val Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn
 195 200 205

atc gcc aac ttt gga ggc gac cca ggc tct gtg acc atc ttt gga gag 672
 Ile Ala Asn Phe Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu
 210 215 220

tca gca gga ggg gaa agt gtc tct gtt ctg gtg ttg tct ccc ttg gcc 720
 Ser Ala Gly Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala
 225 230 235 240

aag aac ctc ttc cac cgg gcc atc tct gag agt ggc gtg gcc ttc act 768
 Lys Asn Leu Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr
 245 250 255

gct ggc ctg gtc agg aag gac atg aag gct gca gct aag caa att gct 816
 Ala Gly Leu Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala
 260 265 270

gtc ctt gct ggg tgt aaa acc acc acc tcg gct gtc ttt gtt cac tgc 864
 Val Leu Ala Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys
 275 280 285

ctg cgc cag aag tcg gag gac gag ctc ttg gac tta acg ctg aag atg 912
 Leu Arg Gln Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met
 290 295 300

aaa cct tta act ctt gat ttg cat gga gac ccc aga gag agc cat ccc 960
 Lys Pro Leu Thr Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro
 305 310 315 320

ttc ctg acc act gtg gtg gat gga gtg ctg ctg ccc aag atg cct gaa 1008
 Phe Leu Thr Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu
 325 330 335

gag att ctg gct gaa aag gat ttc aac act gtc ccc tac atc gtg gga 1056
 Glu Ile Leu Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly
 340 345 350

atc aac aag caa gag ttt ggc tgg ctt ctg cca acg atg atg ggc ttc 1104
 Ile Asn Lys Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe
 355 360 365

ccc ctc tct gaa ggc aag ctg gac cag aag acg gcc acg tca ctc ctg 1152
 Pro Leu Ser Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu
 370 375 380

tgg aag tcc tac ccc atc gct aac atc cct gag gaa ctg act cca gtg 1200
 Trp Lys Ser Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val
 385 390 395 400

gcc act gac aag tat ttg ggg ggg aca gac gac ccc gtc aaa aag aaa 1248
 Ala Thr Asp Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys
 405 410 415

gac ctg ttc ctg gac ttg atg ggg gat gtg gtg ttt ggt gtc cca tct 1296
 Asp Leu Phe Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser
 420 425 430

ES 2 428 070 T3

gtg acg gtg gcc cgt caa cac aga gat gca gga gcc ccc acc tac atg 1344
 Val Thr Val Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met
 435 440 445

tat gag ttt cag tat cgc cca agc ttc tca tcg gac aag aaa ccc aag 1392
 Tyr Glu Phe Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys
 450 455 460

acg gtg atc ggg gac cac ggg gat gag atc ttc tcc gtc ttt ggt ttt 1440
 Thr Val Ile Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe
 465 470 475 480

cca ctg tta aaa ggc gat gcc cca gaa gag gag gtc agt ctc agc aag 1488
 Pro Leu Leu Lys Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys
 485 490 495

acg gtg atg aaa ttc tgg gcc aac ttt gct cgc agt ggg aac ccc aat 1536
 Thr Val Met Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn
 500 505 510

ggg gag ggg ctg ccc cat tgg ccg atg tac gac cag gaa gaa ggg tac 1584
 Gly Glu Gly Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr
 515 520 525

ctt cag atc ggc gtc aac acc cag gca gcc aag agg ctg aaa ggt gaa 1632
 Leu Gln Ile Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu
 530 535 540

gaa gtg gcc ttc tgg aac gat ctc ctg tcc aag gag gca gca aag aag 1680
 Glu Val Ala Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys
 545 550 555 560

cca ccc aag ata aag tga 1698
 Pro Pro Lys Ile Lys
 565

<210> 10
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 10

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr
 20 25 30

Ala Gln Gly Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala
 35 40 45

Gln Pro Val Ala Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu
 50 55 60

Gly Ser Leu Arg Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe
 65 70 75 80

Val Lys Asn Thr Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile
 85 90 95

ES 2 428 070 T3

Gly Gly Gln Met Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu
 100 105 110
 Ile Pro Glu Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro
 115 120 125
 Ala Asp Leu Thr Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His
 130 135 140
 Gly Gly Gly Leu Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala
 145 150 155
 Leu Ala Ala His Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu
 165 170 175
 Gly Ile Trp Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn
 180 185 190
 Trp Gly His Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn
 195 200 205
 Ile Ala Asn Phe Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu
 210 215 220
 Ser Ala Gly Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala
 225 230 235 240
 Lys Asn Leu Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr
 245 250 255
 Ala Gly Leu Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala
 260 265 270
 Val Leu Ala Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys
 275 280 285
 Leu Arg Gln Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met
 290 295 300
 Lys Pro Leu Thr Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro
 305 310 315 320
 Phe Leu Thr Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu
 325 330 335
 Glu Ile Leu Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly
 340 345 350
 Ile Asn Lys Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe
 355 360 365

ES 2 428 070 T3

Pro Leu Ser Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu
 370 375 380

Trp Lys Ser Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val
 385 390 395 400

Ala Thr Asp Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys
 405 410 415

Asp Leu Phe Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser
 420 425 430

Val Thr Val Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met
 435 440 445

Tyr Glu Phe Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys
 450 455 460

Thr Val Ile Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe
 465 470 475 480

Pro Leu Leu Lys Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys
 485 490 495

Thr Val Met Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn
 500 505 510

Gly Glu Gly Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr
 515 520 525

Leu Gln Ile Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu
 530 535 540

Glu Val Ala Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys
 545 550 555 560

Pro Pro Lys Ile Lys
 565

5 <210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

15 <400> 11
 cacccatag gggcagccag cctcgc 26

20 <210> 12
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 12
 ccgctcgagt cactttatct tgggtggcct ctttgc 36

REIVINDICACIONES

1. Esterasas según las SEC ID No. 6, 8 ó 10.
2. Ácido nucleico aislado que codifica una esterasa según la reivindicación 1.
- 5 3. Gen, vector, plásmido y microorganismo recombinante, que presentan un ácido nucleico clonado según la reivindicación 2.
4. Microorganismo recombinante según la reivindicación 3 que contiene adicionalmente al menos un gen chaperona clonado.
5. Uso de la esterasa de la reivindicación 1 para la preparación de alcoholes, ácidos carboxílicos o ésteres enantioméricamente enriquecidos.
- 10 6. Uso de ácidos nucleicos según la reivindicación 2 en un procedimiento para la preparación de un polipéptido con actividad y/o selectividad y/o estabilidad mejoradas en comparación con el polipéptido de SEC ID No. 2 preparado mediante
 - i) mutagénesis de SEC ID No. 5, 7 ó 9,
 - 15 ii) clonación de la secuencia de ácidos nucleicos obtenidos a partir de i) en un vector adecuado con posterior transformación en un sistema de expresión adecuado y
 - iii) detección y aislamiento del correspondiente polipéptido con actividad y/o selectividad y/o estabilidad mejoradas.

Fig. 1:

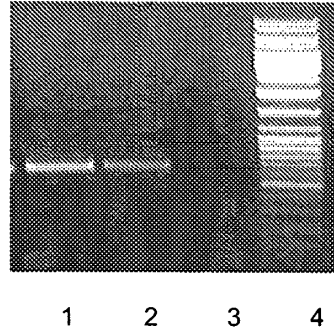


Fig. 2:

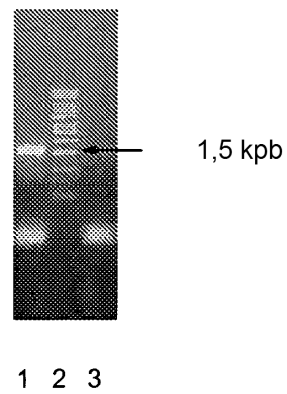


Fig. 3:

```

gammaPLE (92) CDEPVEQMTSDLETNGKERLTLE
PLE2 (92) CDEPVEQMTSDLETNGKERLTLE
PLE3 (92) CDEPVEGOMTSDLETNKKERLLE
PLE4 (92) CDEPVEGOMTSDLETNKKERLLE
PLE5 (92) CDEPVEGOMLSDLETNKKERLLE
    
```

ES 2 428 070 T3

gammaPLE (148) LVGGAPMYDGVLA
PLE2 (148) LVGGAPMYDGVLA
PLE3 (148) LVGGASTYDGLALA
PLE4 (148) LVGGASTYDGLALA
PLE5 (148) LVGGASTYDGLALA

gammaPLE (252) GVALTVLNR
PLE2 (252) GVALTVLNR
PLE3 (252) GVALTAGLNR
PLE4 (252) GVALTAGLNR
PLE5 (252) GVALTAGLNR

gammaPLE (304) MKPTEIDDFHGQKDCCHPELPTV
PLE2 (304) MKPTEIDDFHGQKDCCHPELPTV
PLE3 (304) MKPTEIDLHGIERKDCCHPELPTV
PLE4 (304) MKPTEALDNLHGIERKDCCHPELPTV
PLE5 (304) MKPTEIDLHGIERKDCCHPELPTV

gammaPLE (477) VFGFELLEGDA
PLE2 (477) VFGAPELLEGDA
PLE3 (477) VFGAPELLEGDA
PLE4 (477) VFGAPELLEGDA
PLE5 (477) VFGFELLEGDA

Fig. 4:

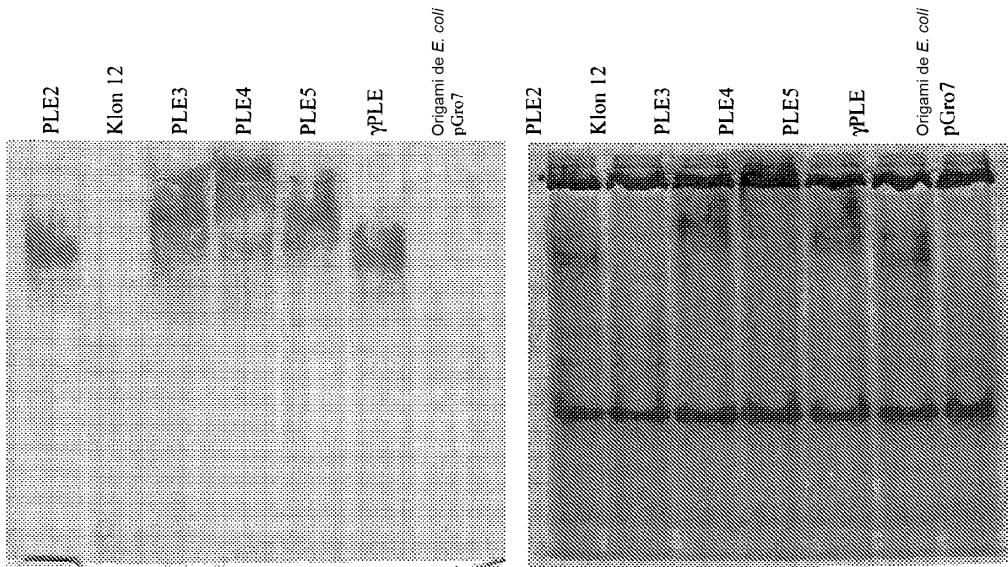


Fig. 5:

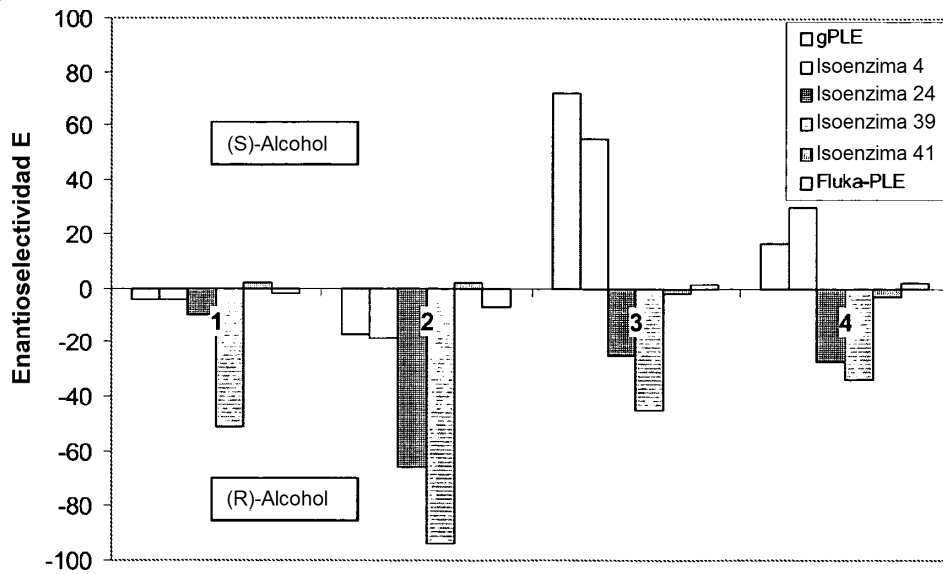
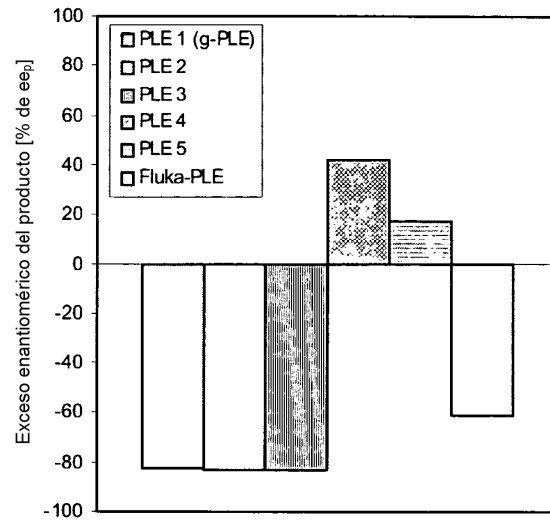


Fig. 6



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 [0005] [0007] [0025] [0091]
- EP 1444367 A [0016]
- WO 9108216 A [0018]
- EP 127839 A [0021] [0023]
- EP 549721 A [0021]
- DE 102006031600 [0027] [0043]

10 Literatura no patente citada en la descripción

- BORNSCHEUER, U.T. ; KAZLAUSKAS R.J. Hydro-lases in Organic Synthesis. Wiley-VCH, 2005 [0002]
- FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry. Springer, 2004 [0003]
- JONES, J.B. *Pure Appl. Chem.*, 1990, vol. 62, 1445-1448 [0003]
- JONES. *Can. J. Chem.*, 1985, vol. 63, 452-456 [0003]
- LAM, L.K.P. *J. Org. Chem.*, 1986, vol. 51, 2047-2050 [0003]
- SEEBACH, D. *Chimia*, 1986, vol. 25 (40), 315-318 [0004]
- FARB, D. et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980, vol. 203, 214-226 [0004]
- HEYMANN, E. ; JUNGE, W. *Eur. J. Biochem.*, 1979, vol. 95, 509-518 [0004]
- *Eur. J. Biochem.*, 1979, vol. 95, 519-525 [0004]
- LAM, L.K.P. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, vol. 110, 4409-4411 [0004]
- TAKAHASHI, T. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 11565-11571 [0005]
- *FEBS Lett.*, 1991, vol. 280, 297-300 [0005]
- FEBS LETT. *FEBS Lett.*, 1991, vol. 293, 37-41 [0005]
- DAVID, L. *Eur. J. Biochem.*, 1998, vol. 257, 142-148 [0005]
- LANGE, S. et al. *ChemBioChem*, 2001, vol. 2, 576-582 [0005]
- THOMAS, JG. *Protein Expression and Purif.*, 1997, vol. 11, 289-296 [0006]
- CHAN ; COHEN. High Frequency Transformation of *Bacillus subtilis* Protoplasts by Plasmid DNA. *Mol Gen Genet.*, 1979, vol. 168 (1), 111-5 [0015]
- KIESER et al. Practical *Streptomyces* Genetics. *The John Innes Foundation Norwich.*, 2000 [0015]
- SAMBROOK et al. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0015]
- IRANI ; ROWE. Enhancement of transformation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Mg²⁺ and heat. *Biotechniques*, 1997, vol. 22, 54-56 [0015]
- BALBAS, P. ; BOLIVAR, F. Design and construction of expression plasmid vectors in *E. coli*. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 185, 14-37 [0015]
- Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses. Butterworth, 1988, 205-225 [0015]
- Universal GenomeWalker™ Kit User Manual. Clontech, Marz 2000 [0015]
- TRIGLIAT. ; PETERSON, M. G. ; KEMP, D.J. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.*, 1988, vol. 16, 8186 [0015]
- HOGAN, B. ; BEDDINGTON, R. ; COSTANTINI, F. ; LACY, E. Manipulating the Mouse-Embryo; A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1994 [0018]
- STUDIER, W. F. ; ROSENBERG A. H. ; DUNN J. J. ; DUBENDROFF J. W. Use of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 185, 61-89 [0021]
- GLOVER, D. M. DNA cloning: a practical approach. IRL Press Ltd, 1985, vol. I-III [0021]
- Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses. Butterworth, 1988, 179-204 [0021]
- GOEDEL, D. V. Systems for heterologous gene expression. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 185, 3-7 [0021]
- SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F. ; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0021] [0052]
- LEE et al. *Nature*, 1981, vol. 294 (5838), 228-232 [0023]
- SHARMA B. P. ; BAILEY L. F. ; MESSING R. A. Immobilisierte Biomaterialien - Techniken und Anwendungen. *Angew. Chem.*, 1982, vol. 94, 836-852 [0029]
- PARADKAR, V. M. ; DORDICK, J. S. Aqueous-Like Activity of α -Chymotrypsin Dissolved in Nearly Anhydrous Organic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, vol. 116, 5009-5010 [0029]

- **MORI, T. ; OKAHATA, Y.** A variety of lipi-coated glycoside hydrolases as effective glycosyl transfer catalysts in homogeneous organic solvents. *Tetrahedron Lett.*, 1997, vol. 38, 1971-1974 [0029]
- **OTAMIRI, M. ; ADLERCREUTZ, P. ; MATTHIAS-SON, B.** Complex formation between chymotrypsin and ethyl cellulose as a means to solubilize the enzyme in active form in toluene. *Biocatalysis*, 1992, vol. 6, 291-305 [0029]
- **KAMIYA, N. ; OKAZAKI, S.-Y. ; GOTO, M.** Surfactanthorseradish peroxidase complex catalytically active in anhydrous benzene. *Biotechnol. Tech.*, 1997, vol. 11, 375-378 [0029]
- **E. KATCHALSKI-KATZIR ; D. M. KRAEMER.** *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2000, vol. 10, 157 [0030]
- Metal-chelate affinity chromatography. **PETTY, K.J. et al.** *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley and Sons, 1986, vol. 2 [0030]
- **CLAIR, N. ; WANG, Y.-F. ; MARGOLIN, A. L.** Co-factor-bound cross-linked enzyme crystals (CLEC) of alcohol dehydrogenase. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, vol. 39, 380-383 [0031]
- *Organikum.* VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1986, S. 388ff, S. 571ff [0036]
- **EIGEN, M. ; GARDINER, W.** Evolutionary molecular engineering based on RNA replication. *Pure Appl. Chem.*, 1984, vol. 56, 967-978 [0045]
- **CHEN, K. ; ARNOLD, F.** Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. *BioTechnology*, 1991, vol. 9, 1073-1077 [0045]
- **HORWITZ, M. ; LOEB, L.** Promoters Selected From Random DNA-Sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, vol. 83, 7405-7409 [0045]
- **DUBE, D. ; L. LOEB.** Mutants Generated By The Insertion Of Random Oligonucleotides Into The Active-Site Of The Beta-Lactamase Gene. *Biochemistry*, 1989, vol. 28, 5703-5707 [0045]
- **STEMMER, P.C.** Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 1994, vol. 370, 389-391 [0045]
- **STEMMER, P.C.** DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, vol. 91, 10747-10751 [0045]
- **LANGE, S.** *ChemBioChem*, 2001, vol. 2, 576-582 [0074]
- **BÖTTCHER, D. ; BRÜSEHABER, E. ; DODERER, K. ; BORNSCHEUER, U.T.** Functional expression of the gamma-isoenzyme of pig liver carboxyl esterase in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, vol. 73 (6), 1282-1289 [0076]
- **KREBSFÄNGER, N.** *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, vol. 22, 641-646 [0078]
- **KREBSFÄNGER, N.** *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, vol. 22, 641-646 [0079]
- **C.S. CHEN ; Y. FUJIMOTO ; G. GIRDAUKAS ; C.J. SIH.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, vol. 104, 7294 [0082]
- **MUSIDLOWSKA-PERSSON, A. ; BORNSCHEUER, U.T.** Substrate Specificity of the γ -isoenzyme of recombinant pig liver esterase towards acetates of secondary alcohols. *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 2002, vol. 19-20, 129-133 [0083]
- **MUSIDLOWSKA-PERSSON, A. ; BORNSCHEUER, U.T.** *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 2002, vol. 19-20, 129-133 [0105]