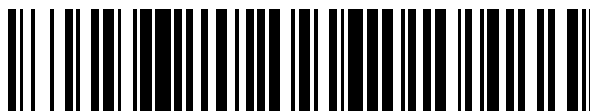


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 559**

51 Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2008 PCT/EP2008/058731**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2009 WO09004093**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2008 E 08774807 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2171061**

54 Título: **Preparación de una esterasa**

30 Prioridad:

04.07.2007 EP 07013092

17.01.2008 EP 08000828

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

05.02.2018

73 Titular/es:

DPX HOLDINGS B.V. (100.0%)

Kabelweg 37

1014 BA Amsterdam, NL

72 Inventor/es:

KIETZMANN, MARTIN;

SCHWAB, HELMUT;

PICHLER, HARALD;

IVANCIC, MIRELA;

MAY, OLIVER y

LUITEN, RUDOLF, GIJSBERTUS, MARIE

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 652 559 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

Preparación de una esterasa

5 La presente invención se refiere a un método para la preparación de una proteína con actividad esterasa que comprende la expresión de un gen que codifica tal proteína en una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*).

La expresión de alto nivel de proteínas con actividad esterasa de hígado de cerdo no se realiza fácilmente. Los informes de Lange *et al.* (2001) [1] indican una producción baja pero detectable de la γ -isoenzima de esterasa de hígado de cerdo (γ -rPLE) en *Pichia pastoris*. Más recientemente, se ha descrito un método por Böttcher *et al.* (2007) [2]. Estos autores demostraron que la expresión de la γ -isoenzima de la esterasa de hígado de cerdo (γ -rPLE) en una cepa de *E. coli* no era un proceso directo. Dicha expresión fracasaba completamente si no se tomaban medidas adicionales. Estas medidas implican no sólo la selección adecuada de una cepa de *E. coli* adecuada, sino también la coexpresión de proteínas chaperonas. En particular, la preparación de γ -rPLE funcional resultó ser posible
10 solamente en la cepa Origami de *E. coli*, que coexpresa cantidades considerables de las proteínas chaperonas designadas como GroEL y GroES.
15

Al menos parte de los problemas encontrados en la expresión adecuada de γ -rPLE se refiere a la aparición de múltiples enlaces disulfuro en la proteína.

20 Sorprendentemente y en contra de la enseñanza reportada por Böttcher *et al.* (2007) [2] se descubrió de acuerdo con la presente invención, que la expresión funcional de una proteína con actividad esterasa de hígado de cerdo (PLE) podría lograrse sin las extensas medidas adicionales descritas por Böttcher *et al.* (2007) [2] y, en particular, sin la coexpresión de genes adicionales.

25 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una proteína con actividad esterasa que comprende la expresión de un gen que codifica dicha proteína en una cepa de *E. coli*, caracterizado por que el gen que codifica la proteína con actividad esterasa tiene al menos un 85 % de identidad con el polinucleótido de SEQ ID NO 11, y codifica una proteína que tiene al menos un 98 % de identidad con la SEQ ID NO
30 12. La SEQ ID NO 11 codifica una enzima que se denomina aquí "esterasa de hígado de cerdo alternativa" abreviada como APLE.

Más preferiblemente, la invención se refiere a un método para la preparación de una proteína con actividad esterasa que comprende la expresión de un gen que codifica dicha proteína en una cepa de *E. coli*, caracterizado por que el
35 gen que codifica la proteína con actividad esterasa tiene al menos un 85 % de identidad, preferiblemente al menos un 90 % de identidad, preferiblemente al menos un 95 % de identidad, preferiblemente al menos un 98 % de identidad, y mucho más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con el polinucleótido de SEQ ID NO 11, y codifica una proteína que tiene al menos un 98 % de identidad, más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO 12.

40 De acuerdo con una realización adicional, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una proteína con actividad esterasa que comprende la expresión de un gen que codifica dicha proteína en una cepa de *E. coli*, caracterizado por que el gen codifica una proteína que tiene al menos un 98 % de identidad, más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO 12. La SEQ ID NO 12 representa la secuencia de
45 aminoácidos de APLE.

De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere a una cepa de *E. coli* recombinante adecuada para la preparación de una proteína con actividad esterasa de acuerdo con el método descrito anteriormente, en la que el organismo contiene un gen que codifica una proteína con actividad esterasa en el que el gen tiene al menos un 85 %
50 de identidad con el polinucleótido de SEQ ID NO 11, y codifica una proteína que tiene al menos un 98 % de identidad, más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO 12.

De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere a una cepa de *E. coli* recombinante adecuada para la preparación de una proteína con actividad esterasa de acuerdo con el método descrito anteriormente, en la que el organismo contiene un gen que codifica una proteína con actividad esterasa, en el que el gen tiene al menos un 85 % de identidad, preferiblemente al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, preferiblemente un 98 % de identidad y mucho más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con el polinucleótido de SEQ ID NO
55 11, y codifica una proteína que tiene al menos un 98 % de identidad, más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO 12.

De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere a una cepa de *E. coli* recombinante adecuada para la preparación de una proteína con actividad esterasa de acuerdo con el método descrito anteriormente, en el que el organismo contiene un gen que codifica una proteína que tiene al menos un 98 % de identidad, más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO. 12.

De acuerdo con una realización adicional, la presente invención se refiere a una cepa de *E. coli* recombinante adecuada para la preparación de una proteína con actividad de esterasa, caracterizada por que la expresión de glutatión reductasa y/o tiorredoxina reductasa está eliminada, por ejemplo, por una mutación.

De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, se suprime la expresión tanto de la glutatión reductasa como de la tiorredoxina reductasa de la cepa de *E. coli* recombinante.

Prinz *et al* (1997) [3] han indicado que la actividad de una proteína que contiene puentes disulfuro (en particular fosfatasa alcalina) expresada en *E. coli* es mayor si esta proteína se ha producido en una cepa en la que la actividad de una reductasa ha sido eliminada. También se demostró que si ambas reductasas se han eliminado, se producirán mutaciones espontáneas que permitirán el crecimiento en condiciones aerobias. Beckwith *et al.* (2005) [4] identificaron una posible mutación espontánea que restablece la capacidad del organismo para crecer en condiciones aerobias. Afirmaron que una mutación en el gen *AhpC*, que comprende una inserción de tres nucleótidos en la región rica en triplete TCT en aproximadamente los codones 36-39 de este gen proporciona este efecto.

Bessette *et al.* (1999) [5] han analizado el sistema de expresión descrito por Prinz *et al.* (1997) en mayor detalle y han demostrado que la coexpresión de la proteína auxiliar DsbC (enlace disulfuro isomerasa) potencia la expresión del activador del plasminógeno tisular activo y de la fosfatasa alcalina activa. Además, se describió que la expresión intracelular de una versión truncada de DsbC daba como resultado una proteína funcional de enlace disulfuro isomerasa.

De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, la *E. coli* recombinante se ha modificado adicionalmente para producir una proteína auxiliar de bajo peso molecular que es capaz de introducir enlaces disulfuro para un plegamiento apropiado de proteínas que requieren enlaces disulfuro y/o es capaz de corregir el plegamiento incorrecto causado por enlaces disulfuro inapropiados.

Las proteínas auxiliares de bajo peso molecular adecuadas mencionadas anteriormente son disulfuro isomerasas. En una realización particularmente preferida, la proteína auxiliar es una proteína indicada como DsbC de *E. coli* (Bessette *et al* (1999)).

Las cepas de *E. coli* que se pueden usar adecuadamente de acuerdo con la presente invención tienen la propiedad de un entorno intracelular menos reductivo que las cepas de *E. coli* de tipo silvestre. Un ejemplo particular de dicha cepa de *E. coli* es la cepa Origami de *E. coli* que posee mutaciones en el gen de la glutatión reductasa y el gen de la tiorredoxina reductasa (Terpe (2006) [6]). Cuando se expresan funcionalmente, estos genes contrarrestan la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma. Por lo tanto, hasta ahora se consideraba que la expresión heteróloga de proteínas que contienen enlaces disulfuro requería la eliminación de las actividades de glutatión y tiorredoxina reductasa, respectivamente.

Sin embargo, se descubrió que solamente una de las mutaciones es suficiente para tener una expresión funcional aumentada de proteínas con actividad de PLE.

Sorprendentemente, los genes codificantes de esterasa adecuados son polinucleótidos que codifican proteínas esterases, y que tienen un uso de codones adaptado a *Pichia*.

Más en particular, la presente descripción se refiere a genes que codifican una proteína esterasa funcional y que tienen una secuencia de nucleótidos con un 85 % de identidad, preferiblemente al menos un 90 % de identidad, preferiblemente al menos un 95 % de identidad, preferiblemente al menos un 98 % de identidad, y mucho más preferiblemente al menos un 99 %, al menos un 95 % de identidad en comparación con el polinucleótido de SEC ID NO 11, y codifica una proteína que tiene al menos un 98 % de identidad, más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con SEC ID NO 12.

La producción de proteínas en grandes cantidades se puede lograr mediante la expresión del gen que codifica la

proteína de interés, entre otros, en huéspedes microbianos como bacterias y levaduras, que son susceptibles de producción fermentativa a gran escala. Los sistemas de expresión proteica bacteriana han sido revisados recientemente por Terpe (2006).

5 De acuerdo con la presente invención, dicho gen que codifica la proteína de interés se expresa en una cepa de *E. coli* transformada. La transformación de *E. coli* con el gen heterólogo se puede realizar mediante cualquier método adecuado, tal como mediante electroporación, transformación por choque térmico, o mediante transformación química.

10 Para la transformación de *E. coli*, el gen que codifica la proteína con actividad de esterasa puede ser parte de un vector, tal como un plásmido, un bacteriófago o un fagémido.

El vector debe contener los elementos funcionales necesarios adecuados para, por ejemplo, selección, replicación, transcripción de regulación génica (iniciación y terminación) y la clonación de la secuencia génica deseada.

15

La selección de una cepa de *E. coli*, un vector, los elementos del vector, el método de transfección, el cultivo de los organismos transfectados y la recolección y aislamiento del polipéptido deseado adecuado para su uso de acuerdo con la presente invención serán obvios para el experto en la técnica.

20 Las preparaciones comerciales de esterasa de hígado de cerdo (PLE), obtenidas de fuentes animales por extracción de hígado de cerdo, se usan ampliamente en química orgánica sintética.

Se ha demostrado que la preparación comercial de enzimas consiste en al menos varias isoenzimas de PLE posiblemente con diferentes especificidades de sustrato.

25

La PLE comercial se usa en una diversidad de reacciones biocatalíticas que aprovechan la amplia especificidad de sustrato y la enantioselectividad de la hidrólisis del éster.

30 Por ejemplo, el documento WO 01/09079 describe el uso de PLE derivada de animales para la hidrólisis selectiva del enantiómero (R) del éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico.

35 En cuanto a la producción farmacéutica, el interés en usar únicamente materias primas derivadas de animales está aumentando debido a las preocupaciones con respecto a enfermedades transmisibles causadas por virus y priones, la producción microbiana de esterases usando tecnología de ADN recombinante puede proporcionar una solución para este problema.

40 En base a la información disponible (Matsushima *et al* (1991) [7]., Lange *et al.* (2001)) sobre la identificación y expresión de la isoenzima PLE principal (γ), se preparó ADNc de hígado de cerdo y se cribó en busca de secuencias relacionadas con la isozima PLE γ . Para este propósito, se diseñaron cebadores de PCR que reconocen fragmentos de ADNc que codifican proteínas relacionadas con la isozima PLE- γ . Mediante la secuenciación de ADN de varios de estos fragmentos de ADNc relacionados con γ -PLE, como se esperaba, se recuperó la secuencia de ADN que codifica γ -PLE conocida, pero además se identificó una segunda isoenzima PLE que difería de la proteína γ -PLE madura en 21 de 548 aminoácidos. Esta nueva isoenzima PLE se denominó APLE para la esterasa de hígado de cerdo alternativa.

45

50 Para la caracterización funcional de las isozimas γ -PLE y APLE con respecto a la especificidad del sustrato, se insertaron tanto secuencias de ADN que codifican γ -PLE como APLE en casetes de expresión diseñados para producción de proteína secretada en *Pichia pastoris*, similar como se describe por Lange *et al.* En contraste con la última publicación, se logró la expresión exitosa de ambas proteínas incluso cuando la secuencia de aminoácidos C-terminal HAEL estaba presente en la proteína codificada. La actividad esterasa se identificó mediante la determinación de la actividad usando un ensayo general de esterasa que usaba alfa-naftilacetato.

55 Sorprendentemente, aunque tiene una identidad de más del 95 % en la secuencia de aminoácidos, se observó una diferencia clara entre γ -PLE y APLE con respecto a la hidrólisis de ésteres del ácido 5-halógeno-2-alkilpent-4-enoico. APLE fue capaz de hidrolizar el éster metílico del ácido racémico (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico de manera muy eficiente, mientras que γ -PLE no hidrolizó este compuesto en absoluto. Además, se pudo demostrar que la hidrólisis del éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico racémico fue por hidrólisis selectiva del enantiómero R solamente: APLE no mostró reactividad hacia éster metílico del ácido (2S, 4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico. Se puede concluir que la hidrólisis enantioselectiva conocida del éster metílico del ácido 5-

cloro-2-isopropilpent-4-enoico por PLE derivada de animales como se describe en el documento WO 01/09079 puede atribuirse a una isoenzima secundaria, APLE, presente en el extracto de hígado de cerdo comercial.

Para la producción a gran escala de una preparación de esterasa no derivada de animales apta para la hidrólisis enantioselectiva de ésteres de ácido 5-halógeno-2-alquilpent-4-enoico, los niveles de expresión basados en *Pichia pastoris* de APLE son insuficientes. Por lo tanto, se contemplaron sistemas de producción de proteínas alternativos, teniendo en cuenta que se requerirá una producción rápida y fiable a escala industrial para la producción económica.

Las isoenzimas PLE están estructuralmente muy relacionadas, y se sabe que la proteína requiere enlaces disulfuro intramoleculares para mantener su integridad estructural y actividad. Muchos sistemas de expresión de proteínas microbianas atractivos solamente permitirán que se formen enlaces disulfuro cuando la proteína se dirige al entorno extracelular, esencialmente como se describió anteriormente para *Pichia pastoris*. La mayoría de las bacterias, especialmente *Escherichia coli*, mantienen un ambiente reductor intracelularmente; sin embargo, se han descrito mutantes de *E. coli* en los que se pueden formar enlaces disulfuro en proteínas expresadas en el citoplasma (Prinz *et al.* (1997)), y están disponibles en el mercado diversas cepas (Origami de *E. coli*, Novagen).

Böttcher *et al.* han utilizado dichas cepas de *E. coli*, y han demostrado que γ -PLE puede producirse con éxito siempre que se tomen medidas adicionales para asegurar el plegamiento adecuado de la proteína γ -PLE mediante la sobreexpresión de proteínas de choque térmico; estas proteínas de choque térmico, o chaperonas, funcionan como auxiliares de plegado o replegamiento para ayudar a las proteínas a alcanzar su conformación natural. Böttcher *et al.* (2007) informan que no se observó expresión de γ -PLE activa en ausencia de grandes cantidades de proteínas chaperonas.

Sorprendentemente, APLE, con solo 21 diferencias de 548 aminoácidos en comparación con γ -PLE, se puede producir como una enzima esterasa activa en cepas de Origami de *E. coli* sin requerir la sobreexpresión concomitante de proteínas chaperonas; incluso en presencia de diversas chaperonas sobreexpresadas, no se nota ningún efecto sobre el nivel de actividad de APLE.

Más sorprendentemente, la alteración del uso de codones del gen APLE nativo (como se aisló del ADNc de hígado de cerdo) proporcionó un impulso adicional a la expresión de APLE en cepas de *E. coli* Origami. Aún más sorprendentemente, la alteración particularmente del uso de codones para parecerse a un conjunto de genes de *Pichia pastoris* demostró ser más eficaz que realizar la "optimización de codones" hacia *E. coli* (para tablas de codones, véase: <http://www.kazusa.or.jp/>). Este resultado indica que existe un efecto directo del ADN y de la secuencia de ARN mensajero derivado sobre la eficacia de plegamiento que produce la proteína APLE activa, en lugar de que el codón óptimo induzca un aumento de la eficacia de traducción y el nivel de producción de proteína.

Se consiguió una mejora adicional de la producción de enzima APLE activa al sobreexpresar una isomerasa de enlace disulfuro endógeno de *E. coli* (DsbC); como ya se mostró por Bessette *et al.* (1999), se pueden construir versiones truncadas de la proteína DsbC, que dan como resultado la localización intracelular de esta proteína. La combinación de la expresión de dicha proteína DsbC truncada da como resultado un aumento considerable en la actividad de APLE expresada por los diversos huéspedes recombinantes de *E. coli*.

La expresión funcional de APLE no requirió en absoluto un entorno no reductor completo en la célula de *E. coli* causado por la interrupción de los genes *trxB* y *gor*. La expresión de APLE activa es posible en *E. coli* BL21 Star (entorno de reducción total!), y en cepas de *E. coli* en las que solamente uno de los genes *trxB* o *gor* estaba inactivo.

La estructura génica del gen APLE óptimo, C8P, se ha usado para construir diversas isoformas de esterases, permitiendo su producción de alto nivel en procesos de fermentación de *E. coli* industriales sencillos y escalables.

Descripción de las figuras

Fig. 1/6:

- A. Ensayo en placa de la cepa X-33 de *P. pastoris* transformada con un casete de expresión de APLE o γ -PLE usando éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico racémico como sustrato.
- B. Ensayo en placa de la cepa X33 de *P. pastoris* transformada con un casete de expresión de APLE o γ -PLE usando éster metílico del ácido (2S, 4E) -5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico como

sustrato

Fig. 2/6:

- 5 A. Mapa funcional del plásmido de expresión pMS470_C8P;
 B. Mapa funcional del plásmido de expresión pMS470_dsbC_C8P

Fig. 3/6:

- 10 Ensayo en placa utilizando éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico racémico como sustrato y extracto libre de células de cepas de *E. coli* BL21 Star como fuente de APLE

Fig. 4/6

- 15 A: Ensayo en placa usando éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico racémico como sustrato.

- 20 1. Origami de *E. coli* [pMS470_C8E] inducido con IPTG 0,1 mM
 2. Origami de *E. coli* [pMS470_C8E] inducido con IPTG 0,5 mM
 3. Origami de *E. coli* [pMS470_C8E] inducido con IPTG 0,1 mM en presencia de chaperona que codifica el plásmido pTf12
 4. Origami de *E. coli* [pMS470_C8P] inducido con IPTG 0,1 mM
 3. Origami de *E. coli* [pMS470_C8P] inducido con IPTG 0,1 mM en presencia de chaperona que codifica el plásmido pTf12

- 25 B. Ensayo en placa usando éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico racémico como sustrato. A la izquierda, se ha aplicado a la placa una muestra de 2 µl de suspensión de células enteras, a la derecha de cada muestra se añadió 1 µl de tampón de fosfato de potasio 1 M, pH 8,0 para resaltar la hidrólisis más eficiente. Los puntos numerados alfanuméricamente tienen los siguientes significados:

- 30 A. Cepa no transformada de *E. coli* Origami
 B. Origami de *E. coli* [pMS470_C8P] almacenado a 4 °C durante 1 mes
 C. Origami de *E. coli* [pMS470_C8P]
35 D. Origami de *E. coli* [pMS470_dsbC_C8P]
 E. PLE técnica (esterasa de hígado de cerdo comercial, Boehringer)

Fig. 5/6:

- 40 A. SDS-PAGE teñida con Coomassie.

- 45 1 = PLE técnica
 2 = Cepa no transformada de *E. coli* Origami
 3 = Origami de *E. coli* [pMS470_C8P]
 4 = Origami de *E. coli* [pMS470_dsbC_C8P]
 5 = Patrón de proteínas preestablecidas de PageRuler

B. Transferencia de Western usando anticuerpo policlonal contra PLE

- 50 1 = PLE técnica
 2 = Cepa no transformada de *E. coli* Origami
 3 = Origami de *E. coli* [pMS470_C8P]
 4 = Origami de *E. coli* [pMS470_dsbC_C8P]

55 Fig. 6/6.

Ensayo en placa cualitativa de diversas construcciones génicas de esterasa usando metilsuccinato de dimetilo como sustrato (tanto γ-PLE como APLE son reactivas hacia este sustrato)

- 1 = Origami B de *E. coli* [pMS470_dsbC_γ-PLE] (γ-PLE nativa)
 2 = Origami B de *E. coli* [p MS470_dsbC_APLE] (APLE nativa)
 3 = Origami B de *E. coli* [p MS470_dsbC_APLE-C8A] (gen APLE C8A)
 4 = Origami B de *E. coli* [p MS470_dsbC_APLE-C8CpO] (gen APLE C8CpO)
 5 = Origami B de *E. coli* [p MS470_dsbC_APLE-C8P] (gen APLE C8P)
 6 = Origami B de *E. coli* [p MS470_dsbC_APLE-C8E2] (gen APLE C8E2)
 7 = Origami B de *E. coli* [p MS470_dsbC_γ-PLE-C8P] (gen γ-PLE C8A)
 8 = Origami B de *E. coli* [p MS470_dsbC_APLE-C8E] (gen APLE C8E)
 9 = Origami B de *E. coli* [p MS470_dsbC_BosTaurus] (gen tipo γ-PLE *BosTaurus*)
 10 = Control negativo

Ejemplos

Ejemplo 1.

- 15 *Aislamiento de la síntesis de ARNm y ADNc; identificación de esterasa de hígado de cerdo alternativa (APLE)*

Se congelaron 0,7 g de hígado de cerdo fresco de un matadero local en nitrógeno líquido y se homogeneizaron usando un mortero. El ARNm se extrajo del homogeneizado utilizando el kit de aislamiento de ARNm Fast Track® 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El protocolo de extracción produjo 13 µg de ARNm. Se tomaron 0,26 µg de ARNm como molde para la síntesis de ADNc usando el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript™ III para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 El ADNc obtenido se usó como molde en una reacción de PCR usando los cebadores específicos fw-PLE y rv-PLE diseñados para amplificar secuencias de esterasa/amidasa de hígado de cerdo relacionadas con el gen descrito por Matsushima et al. (N.º de Acceso a GenBank X63323; SEQ ID NO 1).

30 fw-cPLE: 5'-CAGAATTCATGGCTATCGGGCAGCCAGCCTCGC-3' (SEQ ID NO 3)
 rv-cPLE: 5'-CCGGAATTCAGCCTCCCTTCACAGCTCAG-3' (SEQ ID NO 4),

introduciendo sitios de restricción EcoRI (*cursiva*) con fines de clonación. Las secuencias homólogas a las secuencias conocidas de esterasa/amidasa de hígado de cerdo están subrayadas.

35 La amplificación se realizó usando 1 U Phusion DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finlandia), con 500 ng de ADNc como molde, 20 µmol de cada cebador directo e inverso de acuerdo con los Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Manuals (Finnzymes). Condiciones de PCR: 30 s de desnaturalización a 98 ° C, seguida de 30 ciclos (10 s 98 ° C, 20 s 68 ° C, 1 min 72 ° C) para la amplificación, y una incubación final durante 8 min a 72 ° C para garantizar productos de amplificación de larga duración.

40 El fragmento de ADN de 1,7 kbp resultante se limpió usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN, Hilden, Alemania), se digirió usando la endonucleasa de restricción EcoRI, se insertó en los vectores plasmídicos pHILZ y pHIL-D2 (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) y se transformó en células *E. coli* TOP10 electrocompetentes.

45 La secuenciación de ADN del ADN plasmídico de transformantes seleccionados aleatoriamente reveló dos fragmentos de ADN diferentes, uno de los cuales era completamente idéntico al gen descrito por Matsushima et al., que posteriormente también se identificó como el gen que codifica γ-PLE por Böttcher et al.; el segundo fragmento tenía la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 5 y codificaba una proteína (APLE, SEQ ID NO 6) que difería de γ-PLE en 21 de 548 aminoácidos de la secuencia de proteína madura.

50

Ejemplo 2

Expresión funcional de APLE y caracterización de actividad APLE

55 Tanto los genes γ-PLE como APLE se adaptaron para la expresión secretora en *Pichia pastoris* por fusión con la secuencia señal de secreción del factor de apareamiento α presente en el vector pPICZα (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos).

La secuencia de señal de secreción de factor de apareamiento α y los genes γ-PLE y APLE se amplificaron primero

por separado:

PCR 1: secuencia de señal de secreción de factor de apareamiento α usando los cebadores:

- 5 fw-alfa: 5'-TCTTCGAAGAATTCACGATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGC-3' (SEQ ID NO 7)
 rv-alfa: 5'-GAGGCTGGCTGCCAGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCG-3' (SEQ ID NO 8)

PCR 2 (γ -PLE) y PCR 3 (APLE) usando los cebadores:

- 10 fw-PLE: 5'-AGAGAGGCTGAAGCTGGGCAGCCAGCCTCGCCG-3' (SEQ ID NO 9)
 rv-PLE: 5'-ATGGTACCGAATTCTCACTTTATCTTGGGTGGCTTCTTTG-3' (SEQ ID NO 10)

Los sitios de restricción de EcoRI para fines de clonación están en cursiva, mientras que las secuencias homólogas a los moldes están subrayadas.

- 15 Condiciones de PCR para todas las reacciones: 50 μ l de mezcla de reacción con 2 ng de ADN molde, 0,5 μ M de cada cebador, dNTPs 0,2 mM, 1x tampón Phusion HF y 1U de Phusion DNA-Polymerase, según el Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Manual (Finnzymes), 3 min desnaturalización a 85 °C, amplificación en 30 ciclos (30 s 95 °C, 30 s 57 °C, 15 s 72 °C), y una incubación final de 7 min a 72 °C.

- 20 El molde para la amplificación de la señal de secreción del factor de apareamiento α (PCR1) fue el plásmido pPICZ α ; el molde para la amplificación del gen γ -PLE y APLE (PCR2 y PCR3, respectivamente) fueron los ADNc en los vectores pHILZ descritos en el ejemplo 1.

- 25 Posteriormente, los fragmentos separados obtenidos se combinaron en reacciones de fusión entre el fragmento de factor de apareamiento α y cada uno de los genes de esterasa de hígado de cerdo, como se indica a continuación: fragmento de factor de apareamiento α (PCR1) + fragmento de γ -PLE (PCR2); fragmento de factor de apareamiento α (PCR1) + fragmento APLE (PCR3).

- 30 Se iniciaron las reacciones en un volumen total de 45 μ l con 3 μ l cada uno de PCR1 y PCR2 o PCR3, respectivamente, dNTPs 0,2 mM, 1x tampón Phusion HF y 1 U de Phusion DNA-Polymerase, 3 min a 95 °C seguido de 10 ciclos de 30 s a 95 °C y 45 s a 72 °C. Posteriormente, se añadieron los cebadores fw-alpha y rv-PLE a una concentración final de 0,5 μ M y se consiguió la amplificación del producto de longitud completa mediante desnaturalización de 3 min a 95 °C, amplificación en 30 ciclos (30 s 95 °C, 30 s 57 °C, 15 s 72 °C), y una incubación
 35 final de 7 min a 72 °C.

Los fragmentos resultantes se purificaron utilizando el kit de purificación por PCR QIAquick (QIAGEN, Hilden, Alemania), y después de la digestión con EcoRI se insertó en el vector pGAPZ A (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos), dando como resultado los plásmidos pGAPZA_ γ -PLE y pGAPZA_APLE.

- 40 El ADN de los plásmidos pGAPZA_ γ -PLE y pGAPZA_APLE se linealizó y se introdujo en *Pichia pastoris* X-33 de acuerdo con el manual del kit de expresión Pichia (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos). Los transformantes se seleccionaron en YPD-agar que contenía 100 mg/l de zeocina.

- 45 Los transformantes de *Pichia pastoris* que llevaban pGAPZA_ γ -PLE y pGAPZA_APLE se extendieron sobre agar YPD complementado con 100 mg/l de zeocina y se cultivaron durante 48 h a 30 °C. Después, el material celular se levantó sobre filtros Whatman 541 endurecidos sin cenizas de 70 mm de diámetro (Whatman International Ltd., Maidstone, Gran Bretaña) y se secó. Después, los filtros se remojaron en una mezcla de 6 mg de α -naftilacetato (Sigma, disuelto en 500 μ l de acetona), 2,5 mg de Fast Blue Salt BN (Sigma, disuelto en 125 μ l de agua) y 5 ml de
 50 tampón de fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,0, se incubó para visualizar la actividad esterasa por hidrólisis de α -naftilacetato dando como resultado un producto coloreado. Todas las cepas de *Pichia pastoris* transformadas con casetes de expresión de γ -PLE y APLE mostraron actividad de esterasa aumentada en comparación con la cepa precursora *Pichia pastoris* X-33 no transformada.

- 55 Se desarrolló una configuración similar a la descrita para el ensayo de esterasa general para determinar la actividad de γ -PLE y APLE hacia ésteres de ácido 5-halógeno-2-alkilpent-4-enoico. Los filtros se empaparon en una mezcla de ensayo que consistía en tampón de fosfato de potasio 14 mM, pH 8,0, éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico racémico al 10 % (v/v) (DSM Fine Chemicals Austria Nfg GmbH & Co KG, Linz, Austria), detergente Emulgen 913 al 1 % (v/v) (Kao Corporation, Tokio, Japón), 2 mg/ml de rojo de fenol. La actividad

enzimática se indica por un cambio de color de rojo (pH básico y neutro) a amarillo (pH ácido), causado por la hidrólisis del éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico y la liberación asociada de grupos ácidos.

Como se muestra en la Figura 1A, solamente APLE da una señal positiva que indica que esta enzima es apta para la hidrólisis de éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico racémico; γ -PLE no hidroliza este sustrato en un grado detectable. Más importante aún, se puede concluir que la enzima APLE hidroliza selectivamente el éster metílico del ácido (2R, 4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico: en un ensayo en placa en el que solamente se aplicó el enantiómero S del sustrato al filtro no se puede detectar la hidrólisis de la forma S (Figura 1B).

10 Ejemplo 3.

Diseño de genes APLE sintéticos

Basándose en la secuencia de aminoácidos de APLE madura (SEQ ID NO 6) derivada del gen que codifica APLE (SEQ ID NO 5), se diseñaron y sintetizaron químicamente genes sintéticos con uso de codón alterado y que carecían de la secuencia señal de secreción nativa (proveedor: DNA2.0, Menlo Park, Estados Unidos). Las variantes del gen APLE sintéticas C8P (SEQ ID NO 11), C8A (SEQ ID NO 13), C8CpO (SEQ ID NO 14) y C8E (SEQ ID NO 15) codifican la proteína APLE madura con una Metionina N-terminal adicional como un código de inicio de la traducción requerido (SEQ ID NO 12).

Para estudios de expresión en *E. coli*, se insertaron genes APLE sintéticos en el plásmido pMS470 (Balzer et al. (1992) [8]). La amplificación por PCR (para condiciones véase el Ejemplo 1) se usó para añadir un sitio de restricción *NdeI* (incluyendo un codón de inicio ATG) al extremo 5' y un sitio de restricción *HindIII* al extremo 3', respectivamente, usando los siguientes cebadores:

Para el gen APLE C8P, se diseñaron los siguientes cebadores de PCR

Fw-C8P (SEQ ID NO 16):

CTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGACAACCAGCTTCGCCGCC

Rv-C8P (SEQ ID NO 17):

CCCCCCCCCCCCAAGCTTATTACAATTCGGCGTGCTTTATCTTAGG

Para el gen APLE C8A, se diseñaron los siguientes cebadores de PCR

Fw-C8A (SEQ ID NO 18):

ATTTATACATATGGGACAACCAGCTTCGCCGCCTGTGC

Rv-C8A (SEQ ID NO 19):

CCGCCAAGCTTATTACAATTCAGCGTGCTTAATCTTTGGAGGC

Para el gen APLE C8CpO, se diseñaron los siguientes cebadores de PCR

Fw-C8CpO (SEQ ID NO 20):

ATTTATACATATGGGCCAACCTGCTTCTCCACCTGTTG

Rv-C8CpO (SEQ ID NO 21):

CCGCCAAGCTTATTACAATTCAGCATGCTTGATCTTTGGTGGC

Para el gen APLE C8E, se diseñaron los siguientes cebadores de PCR

Fw-C8E (SEQ ID NO 22):

ATTATACATATGGGACAACCAGCTTCGCCGCTGTCCG

Rv-C8E (SEQ ID NO 23):

5 CCGCCAAGCTTATTACAATTCGGCGTGCTTTATCTTAGGTGGC

Los sitios de restricción NdeI y HindIII para fines de clonación están en cursiva, las secuencias homólogas a las plantillas génicas están subrayadas.

10 Los fragmentos resultantes se insertaron en pMS470 digerido con *NdeI/HindIII*, creando los plásmidos pMS470_C8P, pMS470_C8A, pMS470_C8CpO, y pMS470_C8E. Un mapa del plásmido pMS470_C8P se representa en la Figura 2A.

Se obtuvieron secuencias naturales de APLE y γ -PLE como ADNc de hígado de cerdo como se describe en el ejemplo 1. Estos genes naturales se amplificaron y se transfirieron a vectores de expresión de *E. coli* usando los siguientes cebadores:

20 Fw-PLEnat (SEQ ID NO 24)
ATTATACATATGGGGCAGCCAGCCTCGCCGCTG
 Rv-PLEnat (SEQ ID NO 25)
CCGCCAAGCTTATCACAGCTCAGCATGCTTTATCTTGGGTGG

Los sitios de restricción NdeI y HindIII para fines de clonación están en cursiva, las secuencias homólogas a las plantillas están subrayadas.

25 Debido a que estos genes naturales tienen un sitio de restricción *HindIII* interno, fue necesaria una ligación en dos etapas: primero se insertó el fragmento más largo con *NdeI* y *HindIII* en pMS470, posteriormente se completó cada gen añadiendo el fragmento *HindIII* 3', lo que dio como resultado los vectores de expresión final pMS470_ γ -PLE y pMS470_APLE, respectivamente.

30 Ejemplo 4.

Transformación de vectores de expresión de APLE en un huésped *E. coli* adecuado: expresión funcional de APLE en *E. coli*

35 Para analizar la expresión de esterases en *E. coli*, se usaron los siguientes procedimientos para el cultivo y la preparación de células para el análisis de la actividad.

40 Para los ensayos en placa, las cepas de *E. coli* que albergan diversos plásmidos de expresión se extendieron sobre placas de LB-agar que contenían 100 μ g/ml de ampicilina I y 0,1 mM de IPTG, y se incubaron durante 16 horas a 37 °C.

45 Para ensayos de cultivo líquido, las cepas de *E. coli* que llevaban el plásmido de expresión respectivo se inocularon en 5 ml de caldo Luria-Bertani (LB) con 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron a 28 °C en agitación continua durante 16 horas. Este cultivo se usó a continuación para inocular 250 ml de caldo LB con 100 μ g/ml de ampicilina, en matraces agitados de 1 l. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,6 a 0,8 a 600 nm, se añadió IPTG a una concentración final de 0,1 mM para inducir la expresión génica. Las células se cosecharon después de 16 a 20 h de incubación a 28 °C.

50 Ensayos en placa: El ensayo sobre células cultivadas en placas de agar se ha descrito en el Ejemplo 2 con diversos sustratos de esterasa

55 Análisis de actividad en cultivos líquidos de *E. coli*: La actividad de esterasa se determinó cuantitativamente sobre suspensiones celulares en tampón MOPS (100 mM) con acetato de p-nitrofenilo 5 mM como sustrato. La cantidad de p-nitrofenol liberado se determinó espectrofotométricamente a 405 nm. Una unidad (U) de actividad esterasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo (pH 7,5, 37 °C).

Los casetes de expresión para los diferentes genes que codifican APLE se transformaron en diversas cepas de *E.*

coli: cepas de expresión génica regulares, como cepas de *E. coli* BL21, y se usaron cepas de *E. coli* diseñadas específicamente que permiten la expresión intracelular funcional de proteínas que requieren enlaces disulfuro intramolecular para el plegamiento correcto y la actividad enzimática (Prinz et al., Bessette et al.) como cepas huésped de expresión. Para este propósito, se utilizaron cepas de *E. coli* comercialmente disponibles de la familia 5 Origami (Novagen), especialmente Origami 1, Origami 2 y Origami B.

Se observó la expresión funcional de APLE (SEQ ID NO 12) en la cepa de expresión estándar *E. coli* BL21 Star (Figura 3), sin embargo, la actividad estaba muy por debajo de las actividades obtenidas mediante el uso de cepas de Origami de *E. coli*.

10

Las cepas de *E. coli* Origami se transformaron con los vectores de expresión respectivos, y los transformantes seleccionados se evaluaron posteriormente para determinar la expresión de esterasa mediante la colocación en placas de ensayo específicas de sustrato o a través de cultivos de matraces oscilantes.

15 Los niveles de expresión de varias variantes del gen APLE se resumen en la Figura 4A y en la Tabla 1; el gen C8E tiene solamente cambios menores en comparación con el gen APLE natural. La Figura 4A muestra la diferencia de expresión de C8E y C8P como tal y en presencia de la chaperona pTf16; los resultados de la placa se confirman mediante los resultados del matraz de agitación presentado en la Tabla 1.

Cepa huésped de <i>E. coli</i>	Plásmidos de expresión de APLE	Actividad esterasa (u/ml)
Origami 1/2/B	-	0,8
Origami 1	pMS470_C8E	1,2
Origami 1	pMS470_C8P	9,1
Origami 2	pMS470_C8P	9,6
Origami B	pMS470_C8P	10,7

20

Se realizó una serie de experimentos para evaluar si la coexpresión de diversas chaperonas de choque térmico contribuía a la expresión de APLE. Los resultados (resumidos en la tabla 2) muestran que la expresión de proteína de choque térmico/chaperona no afecta significativamente a la producción de APLE.

Huésped de <i>E. coli</i>	Plásmido de expresión de APLE	Plásmido de expresión de proteína de choque térmico	
Origami 1	-		0,8
Origami 1	pMS470_C8P		9,2
Origami 1	pMS470_C8P	pG-KJ E8	8,1
Origami 1	pMS470_C8P	pGro7	9,3
Origami 1	pMS470_C8P	pKJE7	10,1
Origami 1	pMS470_C8P	pG-Tf2	9,2
Origami 1	pMS470_C8P	pTf16	8,8

25

Ejemplo 5.

Aumento en la expresión de APLE a través de la adición de DsbC

30 Sin observar el efecto de las proteínas de choque térmico co-expresadas, se investigó si otros cofactores como la sobreexpresión del gen de disulfuro-isomerasa endógeno de *E. coli* dsbC (Bessette et al.) afectarían a la expresión de APLE en *E. coli*.

Se usó ADN cromosómico de *E. coli* Top10F' como molde para amplificar una versión truncada del gen de *E. coli* dsbC (la proteína DsbC nativa se secreta al periplasma, la proteína DsbC truncada permanece en el compartimento intracelular) por la cadena de polimerasa reacción (PCR) con Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finlandia), usando tampón Phusion HF y las siguientes condiciones: 5 minutos de desnaturalización a 95 °C, amplificación en 30 ciclos (10 s 98 °C, 30 s 66 °C, 30 s 72 °C), y una incubación final de 8 min a 72 °C. Los cebadores usados se diseñaron para incluir una secuencia de Shine-Dalgarno frente a la secuencia de codificación

40 DsbC truncada:

Fw-dsbC (SEQ ID NO 26):

5'-CGGATCCTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAATGGATGACGCGGCAATTCAACAAAC G-3'

5 Rv-dsbC (SEQ ID NO 27):

5'-CGGATCCTTATTTACCGCTGGTCATTTTTTGGTGTTCG-3'

El producto de PCR se digirió con *Bam*HI y se insertó en el sitio de restricción *Bam*HI del plásmido de expresión APLE pMS470_C8P. DsbC y C8P están separados por 49 pb. Las construcciones se verificaron por secuenciación. La construcción se denominó pMS470_dsbC_C8P y mejoró la expresión de APLE drásticamente (véase la Figura 4 para los ensayos en placa, y la Tabla 3). En la Figura 2B se representa un mapa funcional del plásmido pMS470_dsbC_C8P.

Cepa huésped de <i>E. coli</i>	Plásmidos	Actividad esterasa (u/ml)
Origami B	-	0,8
Origami 1	-	0,8
Origami 1	pMS470_C8P	9,0
Origami 1	pMS470_dsbC_C8P	47
Origami B	pMS470_C8P	10,5
Origami B	pMS470_dsbC_C8P	59

15

Para confirmar que la actividad esterasa observada se debió a la expresión funcional del gen que codifica APLE, se realizaron experimentos de transferencia de Western. Después de la fermentación, las células de *E. coli* se centrifugaron a 5.000 g durante 10 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en 4 volúmenes de tampón de fosfato de potasio 20 mM, pH 8,0, y se combinaron 2-2,5 µl de la suspensión celular con 17,5 - 5 µl de tampón de carga de SDS, se calentó a 95 °C durante 10-15 min y se cargó en un gel de SDS-PAGE al 12,5 %. Se detectó APLE mediante análisis de transferencia Western usando un anticuerpo policlonal de conejo contra esterasa de hígado porcino (abcam, Cambridge, Reino Unido) como anticuerpo primario, y anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Leinco Technologies Inc., St. Louis, Estados Unidos) como anticuerpo secundario. La detección por transferencia Western se realizó por Lumi-Phos™ WB Chemiluminescent Substrate (AP) (Pierce, Rockford, Estados Unidos) y la detección de quimioluminiscencia en G: Box HR (Syngene, Cambridge, Reino Unido), o por una solución de detección BCIP/NBT (CALBIOCHEM; La Jolla, Estados Unidos) y tinción directa de la membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL™, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

La Figura 5 muestra el gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie (Figura 5A) y los resultados del experimento de transferencia de Western (Figura 5B), lo que indica que el nivel de expresión de la proteína es paralelo a la diferencia de actividad. La figura 5A también muestra que DsbC truncado está muy bien expresado.

Ejemplo 6.

35 Preparación de nuevas cepas huésped de *E. coli* y análisis de las propiedades de producción de APLE de estos huéspedes

La cepa *Escherichia coli* K12 RV308 ΔtrxB; Δgor se construyó a partir de la cepa de *E. coli* RV308 (ATCC 31608). De forma similar a lo descrito por Prinz et al., se inactivaron dos genes implicados en la reducción de disulfuro intracelular. Estos dos genes, trxB y gor que codifican la tioredoxina reductasa y la glutatión oxidoreductasa, respectivamente, se inactivaron por delección usando la tecnología de recombinación de sitio dirigido de acuerdo con los procedimientos descritos por Datsenko et al. (2000) [9]

El resultado inicial de esta modificación es que la cepa de *E. coli* ya no es capaz de crecer de forma aerobia, excepto en presencia de un agente reductor; sin embargo, las mutaciones supresoras que restauran el crecimiento aeróbico en ausencia de un reductor se seleccionan fácilmente. Estas propiedades y el cambio fenotípico se han descrito previamente en cepas de *E. coli* en las que los genes trxB y gor se inactivaron usando un enfoque diferente.

En detalle: los casetes de delección se obtuvieron mediante PCR usando los siguientes cebadores y el plásmido pKD3 como molde:

50

La aplicación en esta reacción de fw-trxB (SEQ ID NO 28): 5'-
 GTAAATTCCTACAATCCTGCCATTGTCTGCCAACAACTATGGGGATCTTGTGTA
 GGCTGGAGCTGCTTC-3' y rv-trxB (SEQ ID NO 29):: 5'-
 CCCATAGTCGCATGGTGTGCGCTTCTTTACTTTTGTACTGATTTGTAAAACATATG
 5 AATATCCTCCTTAG-3' da como resultado un casete de delección para el trxB. La aplicación en esta
 reacción de fw-gor (SEQ ID NO 30): 5'-
 CCTATTACGTCTCGCGCTACAATCGCGGTAATCAACGATAAGGACACTTTGTCTGT
 GTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' y rv-gor (SEQ ID NO): 5'-
 10 CTGATAGCGGAAACGTAATTAAGGGCTAAGAGCACACTACTCTTAGCCCTTTAACCC
 ATATGAATATCCTCCTTAG-3' da como resultado un casete de delección para el gen gor.

Los casetes de delección trxB y gor se transformaron por separado en una cepa de *E. coli* RV308 que ya contiene el plásmido pKD46, y los transformantes exitosos se seleccionaron en base a su resistencia adquirida hacia el antibiótico cloranfenicol. El intercambio correcto del gen trxB o el gen gor por los respectivos casetes de delección se
 15 confirmó mediante controles de PCR y transferencia de Southern. El gen de resistencia al cloranfenicol se eliminó posteriormente por transformación con el plásmido pCP20, codificando una enzima FLP recombinasa [referencia 6]. La cepa de *E. coli* resultante RV308 Δ trxB se verificó de nuevo para una eliminación limpia de trxB usando PCR y transferencia Southern. De forma similar, se confirmó la eliminación limpia del gen gor en la cepa RV308 de *E. coli*.

20 Partiendo de la cepa de *E. coli* RV308 Δ trxB, se realizó exactamente el mismo conjunto de reacciones para realizar una eliminación limpia del gen gor. Dado que el resultado inicial de esta segunda modificación, como se describe por Prinz et al., es que esta cepa de *E. coli* RV308 que tiene tanto trxB como gor eliminado ya no es capaz de crecer aeróbicamente excepto en presencia de un agente reductor, el crecimiento de las cepas de *E. coli* que se suponía que también tenían la delección gor se realizó presencia del agente reductor DTT. Finalmente, RV308 Δ trxB
 25 espontáneo; los mutantes de Δ gor podrían seleccionarse para que el crecimiento aerobio ya no dependa de la presencia de DTT.

Transformación de la cepa de *E. coli* RV308 Δ trxB; las cepas Δ gor e intermedias con solo una única delección de reductasa se transformaron con plásmidos de expresión APLE seleccionados y se evaluaron en un matraz de
 30 agitación para determinar la producción de APLE (Tabla 4).

Huésped de <i>E. coli</i>	Plásmido	
Origami B	-	0,7
RV308 Δ trxB; Δ gor		0,6
Origami B	pMS470_C8P	11,5
RV308 Δ trxB	pMS470_C8P	2,2
RV308 Δ gor	pMS470_C8P	2,8
RV308 Δ trxB; Δ gor	pMS470_C8P	8,0
Origami B	pMS470_dsbC_C8P	56
RV308 Δ trxB	pMS470_dsbC_C8P	1,5
RV308 Δ gor	pMS470_dsbC_C8P	10,2
RV308 Δ trxB; Δ gor	pMS470_dsbC_C8P	42

Ejemplo 7

35 Se sintetizaron químicamente genes sintéticos adicionales que codificaban diversas isoformas naturales de proteína de esterasa de hígado de cerdo. Para la producción de una nueva proteína esterasa, se sintetizó un gen tipo γ -PLE de *Bos taurus*.

Otros nuevos genes codificaron las PLE estererasas conocidas γ -PLE y PICE; también se diseñaron híbridos entre las
 40 isoformas APLE y γ -PLE. La característica común de este último conjunto es que todos se basan en el molde APLE C8P. Partiendo de APLE C8P, solo se cambiaron los codones requeridos para obtener las isoformas o proteínas híbridas.

Los genes con sus proteínas codificadas están representados por:

45 Isoformas naturales: Nuevo gen hipotético de tipo γ -PLE de *Bos taurus* (SEQ ID NO 32). Esterasas

naturales codificadas por C8P: C8P- γ -PLE (SEQ ID NO 34) y C8P-PICE (SEQ ID NO 36).
 Esterasas híbridas codificadas por C8P: C8P-H1 (SEQ ID NO 38), C8P-H2 (SEQ ID NO 40), C8P-H3 (SEQ ID NO 42), y C8P-H4 (SEQ ID NO 44).

5 Todas las secuencias se insertaron en el vector de expresión de *E. coli* de la Figura 2B (pMS470_dsbC_APLE) reemplazando eficazmente el gen C8P.

Los resultados del ensayo en placas cualitativas (véase el ejemplo 2) usando metilsuccinato de dimetilo como sustrato confirman que cada uno de los genes diseñados codifica una esterasa activa (Figura 6). Sin embargo, este
 10 ensayo en placa no permite conclusiones cuantitativas porque no se conoce la actividad específica de las variantes de la enzima hacia el metilsuccinato de dimetilo.

Bibliografía.

- 15 [1] Lange S., Musidlowaska A., Schmidt-Dannert C., Schmitt J., Bornscheuer U.T. (2001) Chem BioChem 2, 576-582
 [2] Böttcher, D., Brüsehaver, E., Doderer, K. and Bornscheuer, U.T. (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, 1282-1289
 [3] Prinz, W.A., Åslund, F., Holmgren, A. and Beckwith, J. (1997) J. Biol.Chem. 272: 15661-15667
 20 [4] Beckwith, J., Åslund, F., Bessette, P.H., Georgiou, G., Ritz, D. and Lim, J. E. US patent No 6,872,563
 [5] Bessette, P.H., Åslund, F., Beckwith, J. And Georgiou, G. (1999) PNAS 96 (24), 13703-13708
 [6] Terpe, K. (2006) Appl. Microbiol. Biotechnol. 72, 211-222.
 [7] Matsushima M, Inoue H, Ichinose M, Tsukada S, Miki K, Kurokawa K, Takahashi T, Takahashi K. (1991). FEBS Lett. 293, 37-41
 25 [8] Balzer D, Ziegelin G, Pansegrau W, Kruff V, Lanka E. (1992). Nucleic Acids Res. 20, 1851-1858
 [9] Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000) PNAS 97, 6640-6645

LISTA DE SECUENCIAS

- 30 <110> DSM IP Assets B.V.
 <120> Preparación de una esterasa
 <130> 26073WO
 35 <150> EP07013092
 <151> 04-07-2007
 <150> EP08000828
 40 <151> 17-01-2008
 <160> 45
 <170> PatentIn versión 3.3
 45 <210> 1
 <211> 1701
 <212> ADN
 <213> Sus scrofa
 50 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1701)
 <223> Esterasa de hígado de cerdo
 55 <400> 1

ES 2 652 559 T3

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

ES 2 652 559 T3

aca	aag	agg	ggc	aga	ctg	ccg	gtg	atg	gtg	tgg	atc	cac	gga	gga	ggc	432
Thr	Lys	Arg	Gly	Arg	Leu	Pro	Val	Met	Val	Trp	Ile	His	Gly	Gly	Gly	
	130					135					140					
ctg	gtg	ttg	ggc	ggg	gca	cca	atg	tat	gat	ggg	gtg	gtg	ctt	gct	gcg	480
Leu	Val	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro	Met	Tyr	Asp	Gly	Val	Val	Leu	Ala	Ala	
145					150					155					160	
cat	gaa	aac	gtg	gtg	gtg	gtg	gcc	atc	cag	tac	cgc	ctg	ggc	atc	tgg	528
His	Glu	Asn	Val	Val	Val	Val	Ala	Ile	Gln	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ile	Trp	
			165					170						175		
gga	ttc	ttc	agc	aca	ggg	gat	gaa	cac	agc	cgg	ggc	aac	tgg	ggt	cac	576
Gly	Phe	Phe	Ser	Thr	Gly	Asp	Glu	His	Ser	Arg	Gly	Asn	Trp	Gly	His	
			180					185					190			
ttg	gac	cag	gtg	gcc	gca	ctg	cac	tgg	gtc	cag	gag	aac	atc	gcc	aac	624
Leu	Asp	Gln	Val	Ala	Ala	Leu	His	Trp	Val	Gln	Glu	Asn	Ile	Ala	Asn	
		195					200					205				
ttt	gga	ggc	gac	cca	ggc	tct	gtg	acc	atc	ttt	gga	gag	tca	gca	gga	672
Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Ile	Phe	Gly	Glu	Ser	Ala	Gly	
	210					215					220					
ggg	gaa	agt	gtc	tct	gtt	ctg	gtg	ttg	tct	ccc	ttg	gcc	aag	aac	ctc	720
Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Pro	Leu	Ala	Lys	Asn	Leu	
225					230					235					240	
ttc	cac	cgg	gcc	atc	tct	gag	agt	ggc	gtg	gcc	ctc	act	gtt	gcc	ctg	768
Phe	His	Arg	Ala	Ile	Ser	Glu	Ser	Gly	Val	Ala	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	
			245					250						255		
gtc	agg	aag	gac	atg	aag	gct	gca	gct	aag	caa	att	gct	gtc	ctt	gct	816
Val	Arg	Lys	Asp	Met	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Gln	Ile	Ala	Val	Leu	Ala	
			260					265					270			
ggg	tgt	aaa	acc	acc	acc	tcg	gct	gtc	ttt	gtt	cac	tgc	ctg	cgc	cag	864
Gly	Cys	Lys	Thr	Thr	Thr	Ser	Ala	Val	Phe	Val	His	Cys	Leu	Arg	Gln	
		275					280					285				
aag	tcg	gag	gac	gag	ctc	ttg	gac	tta	acg	ctg	aag	atg	aaa	ttt	tta	912
Lys	Ser	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Asp	Leu	Thr	Leu	Lys	Met	Lys	Phe	Leu	
	290					295					300					
act	ctt	gat	ttt	cat	gga	gac	caa	aga	gag	agc	cat	ccc	ttc	ctg	ccc	960
Thr	Leu	Asp	Phe	His	Gly	Asp	Gln	Arg	Glu	Ser	His	Pro	Phe	Leu	Pro	
305					310					315					320	
act	gtg	gtg	gat	gga	gtg	ctg	ctg	ccc	aag	atg	cct	gaa	gag	att	ctg	1008
Thr	Val	Val	Asp	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Lys	Met	Pro	Glu	Glu	Ile	Leu	
				325					330					335		
gct	gag	aag	gat	ttc	aac	act	gtc	ccc	tac	atc	gtg	gga	atc	aac	aag	1056
Ala	Glu	Lys	Asp	Phe	Asn	Thr	Val	Pro	Tyr	Ile	Val	Gly	Ile	Asn	Lys	
			340					345					350			
caa	gag	ttt	ggc	tgg	ctt	ctg	cca	acg	atg	atg	ggc	ttc	ccc	ctc	tct	1104
Gln	Glu	Phe	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro	Thr	Met	Met	Gly	Phe	Pro	Leu	Ser	
		355					360					365				

ES 2 652 559 T3

gaa ggc aag ctg gac cag aag acg gcc acg tca ctc ctg tgg aag tcc	1152
Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser	
370 375 380	
tac ccc atc gct aac atc cct gag gaa ctg act cca gtg gcc act gac	1200
Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp	
385 390 395 400	
aag tat ttg ggg ggg aca gac gac ccc gtc aaa aag aaa gac ctg ttc	1248
Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe	
405 410 415	
ctg gac ttg atg ggg gat gtg gtg ttt ggt gtc cca tct gtg acg gtg	1296
Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val	
420 425 430	
gcc cgt caa cac aga gat gca gga gcc ccc acc tac atg tat gag ttt	1344
Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe	
435 440 445	
cag tat cgc cca agc ttc tca tcg gac aag aaa ccc aag acg gtg atc	1392
Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile	
450 455 460	
ggg gac cac ggg gat gag atc ttc tcc gtc ttt ggt ttt cca ctg tta	1440
Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu	
465 470 475 480	
aaa ggc gat gcc cca gaa gag gag gtc agt ctc agc aag acg gtg atg	1488
Lys Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met	
485 490 495	
aaa ttc tgg gcc aac ttt gct cgc agt ggg aac ccc aat ggg gag ggg	1536
Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly	
500 505 510	
ctg ccc cat tgg ccg atg tac gac cag gaa gaa ggg tac ctt cag atc	1584
Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile	
515 520 525	
ggc gtc aac acc cag gca gcc aag agg ctg aaa ggt gaa gaa gtg gcc	1632
Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala	
530 535 540	
ttc tgg aac gat ctc ctg tcc aag gag gca gca aag aag cca ccc aag	1680
Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys	
545 550 555 560	
ata aag cat gct gag ctg tga	1701
Ile Lys His Ala Glu Leu	
565	

<210> 2

<211> 566

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 2

Met Trp Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ala Thr

5

10

ES 2 652 559 T3

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

ES 2 652 559 T3

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

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

Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Leu
 290 295 300

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

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

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

Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser
 355 360 365

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

Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp
 385 390 395 400

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

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

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

Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile
 450 455 460

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

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

ES 2 652 559 T3

500	505	510	
ccc cat tgg ccg atg tac gac cag gaa gaa ggg tac ctt cag atc ggc			1584
Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly			
515	520	525	
gtc aac acc cag gca gcc aag agg ctg aaa ggt gaa gaa gtg gcc ttc			1632
Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe			
530	535	540	
tgg aac gat ctc ctg tcc aag gag gca gca aag aag cca ccc aag ata			1680
Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile			
545	550	555	560
aag cat gct gag ctg tga			1698
Lys His Ala Glu Leu			
565			

<210> 6
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

5

<400> 6

Met Trp Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ala Thr																			
1				5						10								15	
Trp Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg																			
			20						25									30	
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala																			
		35						40										45	
Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg																			
		50						55										60	
Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr																			
																			80
Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met																			
																			95
Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe																			
																			110
Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr																			
																			125
Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu																			
																			140

10

ES 2 652 559 T3

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

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

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

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

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

Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe
 225 230 235 240

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

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

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

Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Phe Ala
 290 295 300

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

Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu Ala
 325 330 335

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

Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu
 355 360 365

Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr
 370 375 380

ES 2 652 559 T3

Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys
385 390 395 400

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

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

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

Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
450 455 460

Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys
465 470 475 480

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

Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
500 505 510

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

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

Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
545 550 555 560

Lys His Ala Glu Leu
565

<210> 7
<211> 43
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5

<220>
<223> cebador

10

<400> 7
tcttcgaaga attcacgatg agatttcctt caatttttac tgc 43

15

<210> 8
<211> 36
<212> ADN
<213> secuencia artificial

ES 2 652 559 T3

<220>
 <223> cebador

5 <400> 8
 gaggctggct gccagcttc agcctctctt ttctcg 36

<210> 9
 <211> 33
 10 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

15 <400> 9
 agagaggctg aagctgggca gccagcctcg ccg 33

<210> 10
 <211> 40
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

25 <400> 10
 atggaccga attctcactt tatctgggt ggcttcttg 40

<210> 11
 <211> 1650
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30

<220>
 <223> proteína que codifica la actividad esterasa

35

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1650)

40 <400> 11
 atg gga caa cca gct tgc ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga 48
 Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15

gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct 96
 Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30

gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg 144
 Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45

ES 2 652 559 T3

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

ES 2 652 559 T3

Leu	Asp	Leu	His	Gly	Asp	Pro	Arg	Glu	Ser	His	Pro	Phe	Leu	Thr	Thr	
290						295					300					
ggt	ggt	gac	gga	ggt	ttg	ttg	cct	aag	atg	cct	gag	gaa	atc	ttg	gcc	960
Val	Val	Asp	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Lys	Met	Pro	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	
305					310					315					320	
gag	aag	gac	ttt	aac	acc	gtc	cca	tac	att	ggt	gga	att	aac	aag	cag	1008
Glu	Lys	Asp	Phe	Asn	Thr	Val	Pro	Tyr	Ile	Val	Gly	Ile	Asn	Lys	Gln	
				325					330					335		
gag	ttc	gga	tgg	ctt	ttg	cca	acg	atg	atg	gga	ttt	cct	ctt	tcc	gag	1056
Glu	Phe	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro	Thr	Met	Met	Gly	Phe	Pro	Leu	Ser	Glu	
			340					345						350		
gga	aag	ttg	gat	caa	aag	acg	gct	acg	tca	ctt	ttg	tgg	aag	tcc	tac	1104
Gly	Lys	Leu	Asp	Gln	Lys	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Trp	Lys	Ser	Tyr	
		355					360						365			
cca	att	gcc	aac	att	cct	gaa	gag	ttg	acc	cca	ggt	gct	acc	gat	aag	1152
Pro	Ile	Ala	Asn	Ile	Pro	Glu	Glu	Leu	Thr	Pro	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	
	370					375					380					
tat	tta	gga	gga	aca	gat	gat	cct	gtc	aaa	aag	aaa	gat	ttg	ttt	ttg	1200
Tyr	Leu	Gly	Gly	Thr	Asp	Pro	Val	Lys	Lys	Lys	Lys	Asp	Leu	Phe	Leu	
385					390					395					400	
gat	ctg	atg	gga	gac	ggt	ggt	ttc	ggc	gtc	cca	tca	ggt	acg	ggt	gct	1248
Asp	Leu	Met	Gly	Asp	Val	Val	Phe	Gly	Val	Pro	Ser	Val	Thr	Val	Ala	
				405					410					415		
cgt	cag	cat	agg	gac	gca	gga	gct	cca	act	tac	atg	tat	gag	ttc	caa	1296
Arg	Gln	His	Arg	Asp	Ala	Gly	Ala	Pro	Thr	Tyr	Met	Tyr	Glu	Phe	Gln	
			420					425					430			
tat	cgt	cca	tct	ttt	tca	tcg	gat	aag	aaa	cct	aag	acg	ggt	att	gga	1344
Tyr	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Ser	Asp	Lys	Lys	Pro	Lys	Thr	Val	Ile	Gly	
		435					440						445			
gat	cat	gga	gac	gaa	att	ttt	tcc	gtc	ttc	ggc	ttc	cca	ttg	ctc	aaa	1392
Asp	His	Gly	Asp	Glu	Ile	Phe	Ser	Val	Phe	Gly	Phe	Pro	Leu	Leu	Lys	
	450					455					460					
ggt	gac	gct	cca	gag	gaa	gaa	gtc	agt	ctt	tct	aag	acg	ggt	atg	aaa	1440
Gly	Asp	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Thr	Val	Met	Lys	
465					470					475				480		
ttt	tgg	gct	aac	ttc	gcc	cgt	agt	gga	aac	cct	aat	gga	gaa	gga	ttg	1488
Phe	Trp	Ala	Asn	Phe	Ala	Arg	Ser	Gly	Asn	Pro	Asn	Gly	Glu	Gly	Leu	
			485						490					495		
cct	cac	tgg	ccg	atg	tac	gat	caa	gag	gag	gga	tac	ctt	caa	att	ggt	1536
Pro	His	Trp	Pro	Met	Tyr	Asp	Gln	Glu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Gln	Ile	Gly	
			500					505					510			
gtc	aac	act	caa	gca	gct	aag	agg	ttg	aaa	ggc	gag	gag	ggt	gct	ttt	1584
Val	Asn	Thr	Gln	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Lys	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Phe	
		515					520						525			
tgg	aac	gac	ctg	ttg	tcc	aag	gaa	gca	gca	aag	aag	cca	cct	aag	ata	1632
Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Pro	Pro	Lys	Ile	

ES 2 652 559 T3

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

5
 <210> 13
 <211> 1650
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10
 <220>
 <223> proteína con actividad esterasa

10
 <400> 13
 atgggacaac cagcttcgcc gcctgtcggt gacaccgctc aaggctcgtgt cttgggtaag 60
 tacgtctctc ttgagggttt ggcacaacct gttgctgtct tcttgggtgt ccctttcgct 120
 aagcctccac ttggatcttt gcgtttcgcc cctcctcaac cagcagagcc atggtctttc 180
 gttaagaaca ctacttccta cctccaatg tgttgtaag aaccaattgg aggtcaaatg 240
 ctttcgatac ttttcaactaa cagaaggaa cgtcttattc ctgagttctc tgaggactgc 300
 ctttacctta acatctacac tctgcccac ttgaccaaga gaggtagatt gcctgttatg 360
 gtttgatcc acggaggtgg tttggttgtt ggtggagcat ccacttacga tggattggct 420
 cttgccgcac acgagaacgt tgttgttgtt gctatccaat acagattggg tatctgggga 480
 ttcttctcca ccggtgacga aactcccgt ggttaactggg gacaccttga ccaagttgct 540

ES 2 652 559 T3

```

gcattgcatt gggccaaga aaacatcgct aacttcggag gtgaccagc ttctgttact 600
atcttcgggtg aaagtgcagg aggtgagagt gtctctgtct tggttttatc cccacttgct 660
aagaaccttt tccaccgtgc tatctccgaa tccgggtgtg ctttcaccgc cggtttggtc 720
agaaaggaca tgaaggccgc agccaagcag attgccgtcc ttgccggatg caagactact 780
actagtgccg tcttcgtcca ctgtttgaga caaaagagtg aagacgaact tttggacctc 840
acattgaaga tgaagttttt cgcccttgac cttcacggag acccaagaga atctcaccca 900
ttcttgacca ctgttggtga cggagttttg ttgccaaaga tgcttgagga aattttggtc 960
gagaaggact tcaacaccgt cccatacatc gttggaatca acaagcagga gttcggttgg 1020
cttttgccaa caatgatggg tttcccactt tccgaaggtg agttggacca aaagacagct 1080
acatcccttt tgtggaagtc ctaccaatc gccaacatcc ctgaagagtt gaccccagtt 1140
gctaccgaca agtaccttgg tggtagcagc gacccagtcg aaaagaagga cttgttcttg 1200
gaccttatgg gtgatgtgtg tttcgggtgc ccatctgtta cagttgctcg tcagcacaga 1260
gatgcaggag ctccaactta catgtacgag ttccaataca gaccatcttt ctcaagtgc 1320
aagaagccaa agaccgttat cggagaccac ggtgacgaaa tcttctccgt cttcggattc 1380
ccattgctta aggggtgacg tccagaggaa gaagtctccc tttctaagac cgttatgaag 1440
ttctgggcta acttcgcccg ttctggtaac ccaaaccggag aaggtttgcc aactggcct 1500
atgtacgacc aagaggaggg atacottcaa atcgggtgca aactcaagc cgctaagcgt 1560
ttgaagggtg aggaagtgc tttctggaac gacctttgt ccaaggaagc agcaagaag 1620
cctccaaaga ttaagcacgc tgaattgtaa 1650

```

<210> 14

<211> 1650

<212> ADN

<213> secuencia artificial

5

<220>

<223> proteína con actividad esterasa

10

<400> 14

```

atgggccaac ctgcttctcc acctgttggt gacaccgctc aaggctcgtg cttgggtaag 60
tacgtttctt tggaaggttt ggctcaacct gttgctgtct tcttgggtgt tccatttgcc 120
aagccaccat taggttcttt aagatttgcct ccaccacagc ctgctgaacc atggtctttc 180
gtcaagaaca ctacttctta cctccaatg tgttgcagc aaccaatcgg tggtaaatg 240
ctttccgatt tattcaccaa cagaaggaa agattgattc cagagttcag tgaggactgt 300
ctatatttga acatttacac tccagctgat ttgaccaaga gaggctgtct gcccgctatg 360

```


ES 2 652 559 T3

gtttgattc acggtggtg tttggtgtc ggtggtgctt ccaacttacga tggtttggct 420
 ttggctgctc acgagaatgt tgttgttgtt gccattcaat acagattaggt tatctgggggt 480
 ttcttctcca ccggtgacga acaactccaga ggtaactggg gtcatattgga ccaagttgct 540
 gctttgcact gggttcaaga aaacattgcc aacttcggtg gtgacccagg ttccgtcact 600
 atctttggtg aatctgctgg tggatgaatcc gtctccgtct tggctctgtc tccattggcc 660
 aagaacttat tccatcgtgc catctctgaa tccggtggtg ccttcaccgc tggtttagtg 720
 agaaaggaca tgaaggctgc tgccaagcaa attgctgtct tggctggttg taagaccacc 780
 acctctgctg tctttgtcca ttgtttgaga caaaagtctg aagatgagct actagatttg 840
 actttgaaaa tgaaattctt tgctttggat ttgcacgggtg acccaagaga atctcatcct 900
 ttcttgacca ccgttgttga tgggtgtctt ttgccaaaga tgccagaaga aatcttggct 960
 gaaaaggatt tcaacactgt tccatacatt gtcggtatta acaagcaaga gtttggctgg 1020
 ttactacca ccatgatggg tttccatta tctgaaggta aactggacca aaagactgcc 1080
 acttcgtgc tatggaaatc ttaccaat gccaacattc cagaagaatt gactccagtt 1140
 gccactgaca agtacttggg tggactgat gatcctgtca agaagaagga cttgttcttg 1200
 gatttgatgg gtgatgttgt tttcgggtt ccatctgtca ccgttgccag acaacaccgt 1260
 gatgctggtg ctccaactta catgtatgag ttccaataca gaccttctt ctctctgac 1320
 aagaagcaa agactgtcat cggtgaccac ggtgatgaaa tcttctccgt ctttggtttc 1380
 ccattattga aggggtgacgc tccagaagaa gaagtttctt tatccaagac cgatcatgaaa 1440
 ttctgggcca actttgccag atccggtaac ccaaattggtg aaggtttacc tcaactggcca 1500
 atgtatgacc aagaagaagg ttacttgcaa atcggtgtca aactcaagc tgccaagaga 1560
 ttgaagggtg aagaagttgc tttctggaat gacttgttgt ccaaggaagc tgccaagaag 1620
 ccaccaaga tcaagcatgc tgaattgtaa 1650

<210> 15
 <211> 1650
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 15
 atggggcagc cagcctcgcc gcctggtgtg gacactgccc agggccgtgt cctggggaag 60
 tacgtcagct tagaaggcct ggcacagccg gtggccgtct tcttgggagt cccttttgcc 120
 aagccccctc tcggatcttt gcgttttgct ccgccgacg ctgcagaacc atggagcttc 180
 gtgaagaaca ccacctccta ccctcccatg tgctgccaag agccaattgg gggacagatg 240

ES 2 652 559 T3

```

ctctctgatc tgtttaccaa ccgtaaggag cgtctcattc cggagttttc tgaagactgt 300
ctctacctga atatttacac ccctgctgac ctgacaaagc gtggccgtct gccggtgatg 360
gtgtggattc acggaggag tctggtggtg ggcggggctt ccacctatga tggactggcc 420
ctcgtcgcgc atgaaaacgt ggtggtggtg gccatccagt accgcctggg catctgggga 480
ttcttcagca caggggacga acacagccgg ggcaactggg gtcacttga ccaggtggcc 540
gcactgcact ggttccagga gaacatcgcc aactttggag ggcaccagg ctctgtgacc 600
atctttggag agtcagcagg aggggaaagt gtctctgttc tgggtgtgtc tcctttggcc 660
aagaacctct tccaccgggc catctctgag agtggcgtgg ccttcaactgc tggcctggtc 720
cgtaaggaca tgaaggctgc agctaagcaa attgctgtcc ttgctgggtg taaaaccacc 780
acctcgctg tctttgttca ctgcctgcgc cagaagtcgg aggacgagct cttggactta 840
acgtgaaga tgaatTTTT cgctcttgat ttgcatggag acccccgtga gagccatccc 900
ttctgacca ctgtggtgga tggagtgtc ctgccaaga tgcctgaaga gattctggct 960
gaaaaggatt tcaacactgt ccctacatc gtgggaatca acaagcaaga gtttgctgg 1020
cttctgcaa cgatgatggg cttccccctc tctgaaggca agctggacca gaagacggcc 1080
acgtcactcc tgtggaagtc ctaccccatc gctaacatcc ctgaggaact gactccagtg 1140
gccactgaca agtatTTGGG ggggacagac gaccccgtca aaaagaaaga cctgttcctg 1200
gacttgatgg gggatgtggt gtttggtgtc ccatctgtga cgggtggccc tcaacaccgc 1260
gatgcaggag cccccaccta catgtatgag tttcagtatc gcccagcctt ctcatcggac 1320
aagaaaccca agacgggtgat cggggaccac ggggatgaaa ttttctccgt ctttggtttt 1380
ccactgtaa aaggcgtatc ccagaagag gaggtcagtc tcagcaagac ggtgatgaaa 1440
ttctgggcca actttgctcg cagtgggaac cccaatgggg aggggctgcc ccattggccg 1500
atgtacgacc aggaagaagg gtacctcag atcggcgtca acaccaggc agccaagcgc 1560
ctgaaagggtg aagaagtggc cttctggaac gatctcctgt ccaaggaggc agcaaagaag 1620
ccaccaaga taaagcatgc tgagctgtga 1650

```

5 <210> 16
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 16
 ctttaagaag gagatataca tatgggacaa ccagcttcgc cgcc 44

15 <210> 17
 <211> 46
 <212> ADN

<213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 5
 <400> 17
 ccccccccc ccaagcttat tacaattcgg cgtgctttat cttagg 46
 <210> 18
 10 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 18
 atttatacat atgggacaac cagcttcgcc gcctgtcg 38
 20 <210> 19
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 19
 30 ccgccaagct tattacaatt cagcgtgctt aatctttgga ggc 43
 <210> 20
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 20
 40 atttatacat atgggccaac ctgcttctcc acctgttg 38
 <210> 21
 <211> 43
 <212> ADN
 45 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <400> 21
 ccgccaagct tattacaatt cagcatgctt gatctttggt ggc 43
 <210> 22
 <211> 38
 55 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador

ES 2 652 559 T3

<400> 22
attatacat atgggacaac cagcttcgcc gcctgtcg 38

5 <210> 23
<211> 43
<212> ADN
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 23
ccgccaagct tattacaatt cggcgtgctt tatcttaggt ggc 43

15 <210> 24
<211> 35
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 24
attatacat atggggcagc cagcctcgcc gcctg 35

25 <210> 25
<211> 42
<212> ADN
<213> secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador

35 <400> 25
ccgccaagct taccacagct cagcatgctt tatcttggt gg 42

40 <210> 26
<211> 57
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220>
<223> cebador

<400> 26
cggatccttt aacttaaga aggagatata atggatgacg cggcaattca acaaacg 57

50 <210> 27
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

55 <220>
<223> cebador

<400> 27
cggatcctta ttaccgctg gtcattttt ggtgttcg 38

ES 2 652 559 T3

<210> 28
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 28
 10 gtaaattccc tacaatcctg cccattgtct gccacaact atgggatct tgtgtaggct 60
 ggagctgctt c 71
 <210> 29
 <211> 71
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 29
 cccatagtcg catggtgtcg cctctttac tttgttact gatttgtaaa acatatgaat 60
 atcctcctta g 71
 25 <210> 30
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 30
 35 cctattacgt ctcgcgctac aatcgcgcta atcaacgata aggacacttt gtctgtgtag 60
 gctggagctg ctc 74
 <210> 31
 <211> 75
 <212> ADN
 40 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 31
 ctgatagcgg aaacgtaatt aagggctaag agcacactac tcttagccct ttaaccatat 60
 gaatatacctc cttag 75
 <210> 32
 <211> 1629
 50 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> proteína con actividad esterasa
 55 <220>
 <221> CDS

ES 2 652 559 T3

<222> (1)..(1629)

<223> Esterasa de hígado bovino

<400> 32

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

5

ES 2 652 559 T3

Asp Leu Ile Ala Asp Val Leu Phe Gly Val Pro Ser Val Asn Val Ala
 405 410 415

cgg cgc cat cgt gac gct ggg gcg ccg acc tat atg tac gaa ttc cag 1296
 Arg Arg His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln
 420 425 430

tac cgc ccg agc ttt agt tca gaa ctg aag ccg aaa act gtg atc ggt 1344
 Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Glu Leu Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
 435 440 445

gat cac ggt gac gaa ctg ttt tcc gtc ttt ggg gca cca ttc cta aag 1392
 Asp His Gly Asp Glu Leu Phe Ser Val Phe Gly Ala Pro Phe Leu Lys
 450 455 460

gac ggt gcg tcg gaa gag gaa att aat ctg agc aaa atg gtg atg aag 1440
 Asp Gly Ala Ser Glu Glu Glu Ile Asn Leu Ser Lys Met Val Met Lys
 465 470 475 480

ttt tgg gcg aac ttc gca cgc aat ggg aac ccg aat ggt gaa ggc tta 1488
 Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Asn Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
 485 490 495

cct cac tgg cca gct tac gat cat aaa gag ggc tat ttg cag atc ggt 1536
 Pro His Trp Pro Ala Tyr Asp His Lys Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
 500 505 510

gtt aac acg cgt gcg gcc gag aaa ctg aag gat aaa gag gta gca ttt 1584
 Val Asn Thr Arg Ala Ala Glu Lys Leu Lys Asp Lys Glu Val Ala Phe
 515 520 525

tgg aat gaa ctg ctg agc cgc gaa gtg gca cgt cat cat acc taa 1629
 Trp Asn Glu Leu Leu Ser Arg Glu Val Ala Arg His His Thr
 530 535 540

<210> 33
 <211> 542
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

10

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 33
 Met Gly Leu Ala Pro Ser Pro Pro Ile Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15

Val Leu Gly Lys His Val Ser Leu Lys Gly Phe Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30

Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45

Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Thr Phe Val Lys Asn Thr
 50 55 60

ES 2 652 559 T3

Ile Ser Tyr Pro Pro Met Cys Ser Gln Asp Pro Val Gly Ala Gln Leu
 65 70 75 80

Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Asn Ile Ser Leu Thr Phe
 85 90 95

Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr
 100 105 110

Lys Arg Ser Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu
 115 120 125

Met Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Val Leu Ser Ala His
 130 135 140

Glu Asn Val Val Val Val Thr Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly
 145 150 155 160

Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu
 165 170 175

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

Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala
 195 200 205

Glu Ser Val Ser Ile Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Arg Asn Leu Phe
 210 215 220

His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Leu Ile Ser Thr Leu Val
 225 230 235 240

Lys Arg Asp Ser Lys Ala Ala Ala Glu Gln Ile Ala Val Ile Ala Gly
 245 250 255

Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Leu Val His Cys Leu Arg Gln Lys
 260 265 270

Thr Glu Asp Glu Leu Leu Glu Ile Thr Leu Lys Met Lys Phe Phe Ala
 275 280 285

Leu Asp Leu His Lys Asp Ser Thr Glu Ser His Pro Phe Leu Pro Thr
 290 295 300

ES 2 652 559 T3

Val Val Asp Gly Met Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Met Leu Ala
 305 310 315 320

Glu Lys Asn Phe Asn Asn Val Pro Tyr Met Val Gly Ile Asn Lys Gln
 325 330 335

Glu Phe Gly Trp Ile Ile Pro Leu Phe Met Ser Tyr Pro Leu Pro Glu
 340 345 350

Asp Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Gln Ser Tyr
 355 360 365

Ser Leu Leu Ser Ile Pro Glu Glu Leu Ser Pro Val Ala Thr Asp Lys
 370 375 380

Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu
 385 390 395 400

Asp Leu Ile Ala Asp Val Leu Phe Gly Val Pro Ser Val Asn Val Ala
 405 410 415

Arg Arg His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln
 420 425 430

Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Glu Leu Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
 435 440 445

Asp His Gly Asp Glu Leu Phe Ser Val Phe Gly Ala Pro Phe Leu Lys
 450 455 460

Asp Gly Ala Ser Glu Glu Glu Ile Asn Leu Ser Lys Met Val Met Lys
 465 470 475 480

Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Asn Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
 485 490 495

Pro His Trp Pro Ala Tyr Asp His Lys Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
 500 505 510

Val Asn Thr Arg Ala Ala Glu Lys Leu Lys Asp Lys Glu Val Ala Phe
 515 520 525

Trp Asn Glu Leu Leu Ser Arg Glu Val Ala Arg His His Thr
 530 535 540

<210> 34
 <211> 1650
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

ES 2 652 559 T3

<220>
<223> proteína con actividad esterasa

5

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1650)

<400> 34
atg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga 48
Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
1 5 10 15

gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct 96
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
20 25 30

gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg 144
Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
35 40 45

ttt gcc ccg ccg caa cca gca gag cca tgg tct ttc gtt aag aac act 192
Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
50 55 60

act tcc tac cct cca atg tgt tgt caa gat cca gtc gta gaa caa atg 240
Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val Val Glu Gln Met
65 70 75 80

acg tca gac cta ttc act aac gga aag gaa agg ctt acc ctg gag ttc 288
Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu Thr Leu Glu Phe
85 90 95

tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg aca 336
Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr
100 105 110

aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga gga ggt ttg 384
Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu
115 120 125

gtt ctg ggc gga gca ccg atg tat gac gga gtg gtt ctt gcc gcg cac 432
Val Leu Gly Gly Ala Pro Met Tyr Asp Gly Val Val Leu Ala Ala His
130 135 140

gag aac gtt gtt gtt gtt gct att caa tac cgt ttg ggt att tgg gga 480
Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly
145 150 155 160

ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat tta 528
Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu
165 170 175

gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac ttc 576
Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe
180 185 190

10

ES 2 652 559 T3

	Tyr	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Ser	Asp	Lys	Lys	Pro	Lys	Thr	Val	Ile	Gly	
			435					440					445				
	gat	cat	gga	gac	gaa	att	ttt	tcc	gtc	ttc	ggc	ttc	cca	ttg	ctc	aaa	1392
	Asp	His	Gly	Asp	Glu	Ile	Phe	Ser	Val	Phe	Gly	Phe	Pro	Leu	Leu	Lys	
		450					455					460					
	ggg	gac	gct	cca	gag	gaa	gaa	gtc	agt	ctt	tct	aag	acg	ggt	atg	aaa	1440
	Gly	Asp	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Thr	Val	Met	Lys	
	465					470					475					480	
	ttt	tgg	gct	aac	ttc	gcc	cg	agt	gga	aac	cct	aat	gga	gaa	gga	ttg	1488
	Phe	Trp	Ala	Asn	Phe	Ala	Arg	Ser	Gly	Asn	Pro	Asn	Gly	Glu	Gly	Leu	
				485						490					495		
	cct	cac	tgg	ccg	atg	tac	gat	caa	gag	gag	gga	tac	ctt	caa	att	ggg	1536
	Pro	His	Trp	Pro	Met	Tyr	Asp	Gln	Glu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Gln	Ile	Gly	
				500					505					510			
	gtc	aac	act	caa	gca	gct	aag	agg	ttg	aaa	ggc	gag	gag	ggt	gct	ttt	1584
	Val	Asn	Thr	Gln	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Lys	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Phe	
			515					520					525				
	tgg	aac	gac	ctg	ttg	tcc	aag	gaa	gca	gca	aag	aag	cca	cct	aag	ata	1632
	Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Pro	Pro	Lys	Ile	
		530					535					540					
	aag	cac	gcc	gaa	ttg	taa											1650
	Lys	His	Ala	Glu	Leu												
	545																

<210> 35
 <211> 549
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 35
 Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15
 Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30
 Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45
 Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
 50 55 60
 Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val Val Glu Gln Met
 65 70 75 80

ES 2 652 559 T3

<220>
<223> proteína con actividad esterasa

5

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1650)

<400> 36
atg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga 48
Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
1 5 10 15

gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct 96
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
20 25 30

gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg 144
Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
35 40 45

ttt gcc ccg ccg caa cca gca gag cca tgg tct ttc gtt aag aac act 192
Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
50 55 60

act tcc tac cct cca atg tgt tgt caa gat cca gtc gca gga caa atg 240
Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val Ala Gly Gln Met
65 70 75 80

acg tca gac cta ttc act aac gga aag gaa agg ctt atc ccg gag ttc 288
Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe
85 90 95

tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg aca 336
Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr
100 105 110

aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga gga ggt ttg 384
Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu
115 120 125

gtt gtt ggc gga gca tcc act tat gac gga ttg gct ctt gcc gcg cac 432
Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His
130 135 140

gag aac gtt gtt gtt gtt gct att caa tac cgt ttg ggt att tgg gga 480
Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly
145 150 155 160

ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat tta 528
Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu
165 170 175

gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac ttc 576
Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe
180 185 190

10

ES 2 652 559 T3

Tyr	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Ser	Asp	Lys	Lys	Pro	Lys	Thr	Val	Ile	Gly		
		435					440					445					
gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca ttg ctc aaa 1392																	
Asp	His	Gly	Asp	Glu	Ile	Phe	Ser	Val	Phe	Gly	Phe	Pro	Leu	Leu	Lys		
		450				455				460							
ggg gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg aaa 1440																	
Gly	Asp	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Thr	Val	Met	Lys		
		465		470					475					480			
ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga ttg 1488																	
Phe	Trp	Ala	Asn	Phe	Ala	Arg	Ser	Gly	Asn	Pro	Asn	Gly	Glu	Gly	Leu		
			485					490					495				
cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att ggt 1536																	
Pro	His	Trp	Pro	Met	Tyr	Asp	Gln	Glu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Gln	Ile	Gly		
			500				505						510				
gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct ttt 1584																	
Val	Asn	Thr	Gln	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Lys	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Phe		
		515				520					525						
tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag ata 1632																	
Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Pro	Pro	Lys	Ile		
		530				535					540						
aag cac gcc gaa ttg taa 1650																	
Lys	His	Ala	Glu	Leu													
			545														

<210> 37
 <211> 549
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 37
 Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15
 Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30
 Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45
 Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
 50 55 60
 Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val Ala Gly Gln Met
 65 70 75 80

<220>
 <223> proteína con actividad esterasa

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1650)

<400> 38
 atg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga 48
 Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15

gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct 96
 Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30

gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg 144
 Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45

ttt gcc ccg ccg caa cca gca gag cca tgg tct ttc gtt aag aac act 192
 Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
 50 55 60

act tcc tac cct cca atg tgt tgt caa gat cca gtc gta gaa caa atg 240
 Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val Val Glu Gln Met
 65 70 75 80

acg tca gac cta ttc act aac gga aag gaa agg ctt acc ctg gag ttc 288
 Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu Thr Leu Glu Phe
 85 90 95

tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg aca 336
 Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr
 100 105 110

aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga gga ggt ttg 384
 Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu
 115 120 125

gtt gtt ggc gga gca tcc act tat gac gga ttg gct ctt gcc gcg cac 432
 Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His
 130 135 140

gag aac gtt gtt gtt gtt gct att caa tac cgt ttg ggt att tgg gga 480
 Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly
 145 150 155 160

ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat tta 528
 Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu
 165 170 175

gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac ttc 576
 Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe
 180 185 190

10

ES 2 652 559 T3

Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
 435 440 445
 gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca ttg ctc aaa 1392
 Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys
 450 455 460
 ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg aaa 1440
 Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys
 465 470 475 480
 ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga ttg 1488
 Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
 485 490 495
 cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att ggt 1536
 Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
 500 505 510
 gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct ttt 1584
 Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe
 515 520 525
 tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag ata 1632
 Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
 530 535 540
 aag cac gcc gaa ttg taa 1650
 Lys His Ala Glu Leu
 545

<210> 39
 <211> 549
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 39
 Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15
 Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30
 Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45
 Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
 50 55 60
 Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val Val Glu Gln Met
 65 70 75 80

ES 2 652 559 T3

<220>
<223> proteína con actividad esterasa

5

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1650)

<400> 40
atg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga 48
Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
1 5 10 15

gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct 96
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
20 25 30

gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg 144
Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
35 40 45

ttt gcc ccg ccg caa cca gca gag cca tgg tct ttc gtt aag aac act 192
Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
50 55 60

act tcc tac cct cca atg tgt tgt caa gaa cca atc gga gga caa atg 240
Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met
65 70 75 80

ctt tca gac cta ttc act aac aga aag gaa agg ctt atc ccg gag ttc 288
Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe
85 90 95

tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg aca 336
Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr
100 105 110

aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga gga ggt ttg 384
Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu
115 120 125

gtt ctg ggc gga gca ccg atg tat gac gga gtg gtt ctt gcc gcg cac 432
Val Leu Gly Gly Ala Pro Met Tyr Asp Gly Val Val Leu Ala Ala His
130 135 140

gag aac gtt gtt gtt gtt gct att caa tac cgt ttg ggt att tgg gga 480
Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly
145 150 155 160

ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat tta 528
Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu
165 170 175

gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac ttc 576
Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe
180 185 190

10

ES 2 652 559 T3

Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly
 435 440 445
 gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca ttg ctc aaa 1392
 Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys
 450 455 460
 ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg aaa 1440
 Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys
 465 470 475 480
 ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga ttg 1488
 Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu
 485 490 495
 cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att ggt 1536
 Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly
 500 505 510
 gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct ttt 1584
 Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe
 515 520 525
 tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag ata 1632
 Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile
 530 535 540
 aag cac gcc gaa ttg taa 1650
 Lys His Ala Glu Leu
 545

<210> 41
 <211> 549
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 41
 Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15
 Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30
 Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45
 Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
 50 55 60
 Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met
 65 70 75 80

<220>
<223> proteína con actividad esterasa

5

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1650)

<400> 42
atg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga 48
Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
1 5 10 15

gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct 96
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
20 25 30

gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg 144
Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
35 40 45

ttt gcc ccg ccg caa cca gca gag cca tgg tct ttc gtt aag aac act 192
Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
50 55 60

act tcc tac cct cca atg tgt tgt caa gaa cca atc gga gga caa atg 240
Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met
65 70 75 80

ctt tca gac cta ttc act aac aga aag gaa agg ctt atc ccg gag ttc 288
Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe
85 90 95

tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg aca 336
Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr
100 105 110

aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga gga ggt ttg 384
Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu
115 120 125

gtt gtt ggc gga gca tcc act tat gac gga ttg gct ctt gcc gcg cac 432
Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His
130 135 140

gag aac gtt gtt gtt gtt gct att caa tac cgt ttg ggt att tgg gga 480
Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly
145 150 155 160

ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat tta 528
Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu
165 170 175

gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac ttc 576
Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe
180 185 190

10

ES 2 652 559 T3

	Tyr	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Ser	Asp	Lys	Lys	Pro	Lys	Thr	Val	Ile	Gly	
			435					440					445				
	gat	cat	gga	gac	gaa	att	ttt	tcc	gtc	ttc	ggc	ttc	cca	ttg	ctc	aaa	1392
	Asp	His	Gly	Asp	Glu	Ile	Phe	Ser	Val	Phe	Gly	Phe	Pro	Leu	Leu	Lys	
			450				455					460					
	ggg	gac	gct	cca	gag	gaa	gaa	gtc	agt	ctt	tct	aag	acg	ggt	atg	aaa	1440
	Gly	Asp	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Thr	Val	Met	Lys	
					470						475					480	
	ttt	tgg	gct	aac	ttc	gcc	cg	agt	gga	aac	cct	aat	gga	gaa	gga	ttg	1488
	Phe	Trp	Ala	Asn	Phe	Ala	Arg	Ser	Gly	Asn	Pro	Asn	Gly	Glu	Gly	Leu	
				485						490					495		
	cct	cac	tgg	ccg	atg	tac	gat	caa	gag	gag	gga	tac	ctt	caa	att	ggg	1536
	Pro	His	Trp	Pro	Met	Tyr	Asp	Gln	Glu	Gly	Tyr	Leu	Gln	Ile	Gly		
				500				505					510				
	gtc	aac	act	caa	gca	gct	aag	agg	ttg	aaa	ggc	gag	gag	ggt	gct	ttt	1584
	Val	Asn	Thr	Gln	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Lys	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Phe	
				515				520					525				
	tgg	aac	gac	ctg	ttg	tcc	aag	gaa	gca	gca	aag	aag	cca	cct	aag	ata	1632
	Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Pro	Pro	Lys	Ile	
				530			535					540					
	aag	cac	gcc	gaa	ttg	taa											1650
	Lys	His	Ala	Glu	Leu												

<210> 43
 <211> 549
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 43
 Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15
 Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30
 Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45
 Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
 50 55 60
 Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met
 65 70 75 80

ES 2 652 559 T3

<220>
<223> proteína con actividad esterasa

5

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1650)

<400> 44
atg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga cga 48
Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
1 5 10 15
gct ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt gct 96
Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
20 25 30
gct ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga tct ttg agg 144
Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
35 40 45
ttt gcc ccg ccg caa cca gca gag cca tgg tct ttc gtt aag aac act 192
Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
50 55 60
act tcc tac cct cca atg tgt tgt caa gaa cca atc gga gga caa atg 240
Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met
65 70 75 80
ctt tca gac cta ttc act aac aga aag gaa agg ctt atc ccg gag ttc 288
Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe
85 90 95
tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg aca 336
Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr
100 105 110
aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga gga ggt ttg 384
Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu
115 120 125
gtt gtt ggc gga gca tcc act tat gac gga ttg gct ctt gcc gcg cac 432
Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His
130 135 140
gag aac gtt gtt gtt gtt gct att caa tac cgt ttg ggt att tgg gga 480
Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly
145 150 155 160
ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat tta 528
Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu
165 170 175
gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac ttc 576
Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe
180 185 190

10

ES 2 652 559 T3

	Tyr	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Ser	Asp	Lys	Lys	Pro	Lys	Thr	Val	Ile	Gly		
			435					440					445					
	gat	cat	gga	gac	gaa	att	ttt	tcc	gtc	ttc	ggc	ttc	cca	ttg	ctc	aaa	1392	
	Asp	His	Gly	Asp	Glu	Ile	Phe	Ser	Val	Phe	Gly	Phe	Pro	Leu	Leu	Lys		
			450				455					460						
	ggt	gac	gct	cca	gag	gaa	gaa	gtc	agt	ctt	tct	aag	acg	gtt	atg	aaa	1440	
	Gly	Asp	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Thr	Val	Met	Lys		
					470						475				480			
	ttt	tgg	gct	aac	ttc	gcc	cg	agt	gga	aac	cct	aat	gga	gaa	gga	ttg	1488	
	Phe	Trp	Ala	Asn	Phe	Ala	Arg	Ser	Gly	Asn	Pro	Asn	Gly	Glu	Gly	Leu		
				485						490					495			
	cct	cac	tgg	ccg	atg	tac	gat	caa	gag	gag	gga	tac	ctt	caa	att	ggt	1536	
	Pro	His	Trp	Pro	Met	Tyr	Asp	Gln	Glu	Gly	Tyr	Leu	Gln	Ile	Gly			
				500				505						510				
	gtc	aac	act	caa	gca	gct	aag	agg	ttg	aaa	ggc	gag	gag	ggt	gct	ttt	1584	
	Val	Asn	Thr	Gln	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Lys	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Phe		
				515				520						525				
	tgg	aac	gac	ctg	ttg	tcc	aag	gaa	gca	gca	aag	aag	cca	cct	aag	ata	1632	
	Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Pro	Pro	Lys	Ile		
				530			535						540					
	aag	cac	gcc	gaa	ttg	taa											1650	
	Lys	His	Ala	Glu	Leu													

<210> 45
 <211> 549
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 45
 Met Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg
 1 5 10 15
 Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala
 20 25 30
 Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg
 35 40 45
 Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr
 50 55 60
 Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met
 65 70 75 80

REIVINDICACIONES

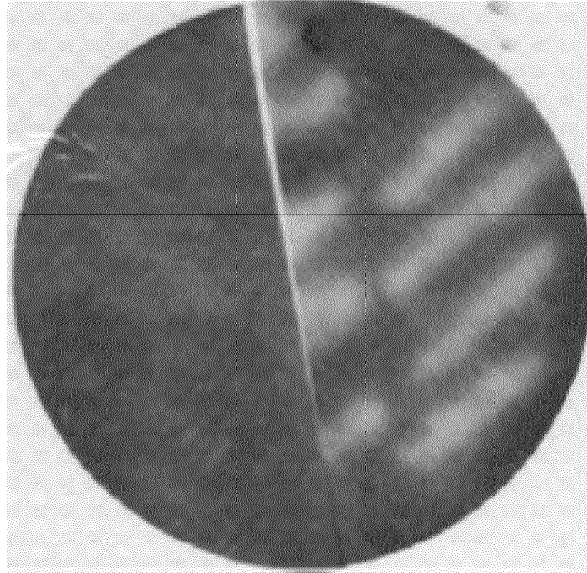
1. Método para la preparación de una proteína con actividad esterasa que comprende la expresión de un gen que codifica dicha proteína en una cepa de *E. coli*, **caracterización por que** el gen que codifica la proteína con actividad esterasa tiene al menos un 80 % de identidad, preferiblemente al menos un 85 % de identidad, preferiblemente al menos un 90 % de identidad, preferiblemente al menos un 95 % de identidad, preferiblemente al menos un 98 % de identidad y mucho más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con el polinucleótido de SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 32, SEQ ID NO 34, SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 38, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 42 o SEQ ID NO 44, y codifica una proteína que tiene al menos un 98 % de identidad, más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 33, SEQ ID NO 35, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 43 o SEQ ID NO 45, respectivamente, y en el que la expresión tiene lugar sin la coexpresión de GroEL y/o GroES de un plásmido.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gen codifica una proteína que tiene al menos un 98 % de identidad, más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO 12.
3. Cepa de *E. coli* recombinante adecuada para la preparación de una proteína con actividad esterasa, **caracterizada por que** el organismo que contiene un gen que codifica la proteína con actividad esterasa tiene al menos un 85 % de identidad, preferiblemente al menos un 90 % de identidad, preferiblemente al menos un 95 % de identidad, preferiblemente al menos un 98 % de identidad y mucho más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con el polinucleótido de SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 32, SEQ ID NO 34, SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 38, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 42 o SEQ ID NO 44, y codifica una proteína que tiene al menos un 98 % de identidad, más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 33, SEQ ID NO 35, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 43 o SEQ ID NO 45, respectivamente, y en la que la expresión tiene lugar sin la coexpresión de GroEL y/o GroES de un plásmido.
4. Cepa de *E. coli* recombinante adecuada para la preparación de una proteína con actividad esterasa de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** la cepa no puede expresar glutatión reductasa y/o tiorredoxina reductasa.
5. Cepa de *E. coli* recombinante adecuada para la preparación de una proteína con actividad esterasa de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** la cepa es incapaz de expresar tanto glutatión reductasa como tiorredoxina reductasa.
6. Cepa de *E. coli* recombinante adecuada para la preparación de una proteína con actividad esterasa de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** la expresión de glutatión reductasa y/o tiorredoxina reductasa se elimina por mutación.
7. Cepa de *E. coli* recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 - 6 obtenida a partir de una cepa de *E. coli* Origami 1, Origami 2 u Origami B.

Fig. 1/6

A

γ -PLE

APLE



B

γ -PLE

APLE

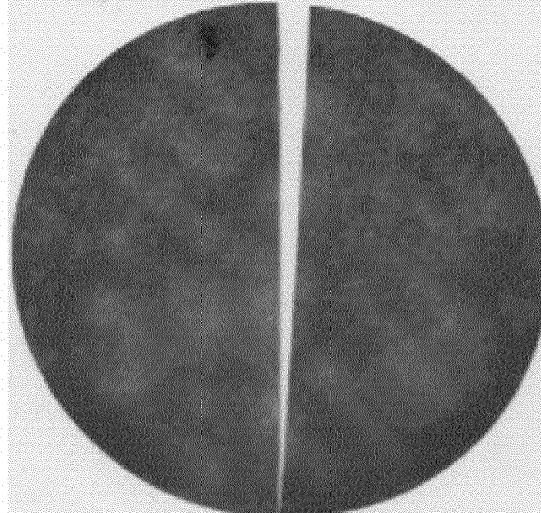
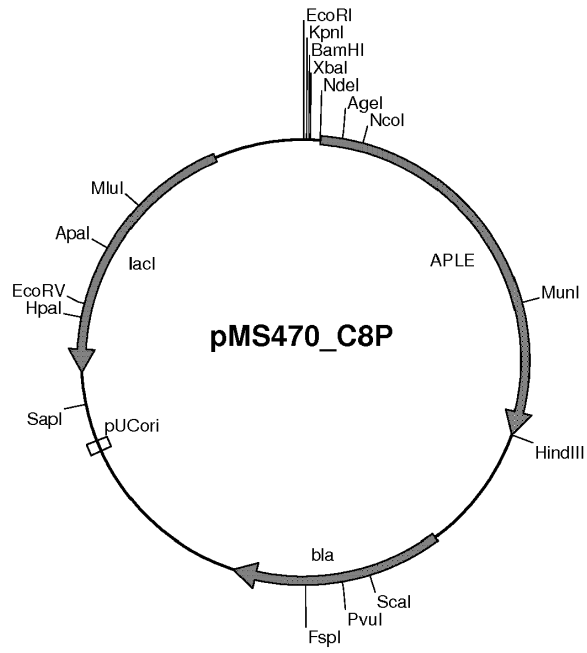


Fig. 2/6

A



B

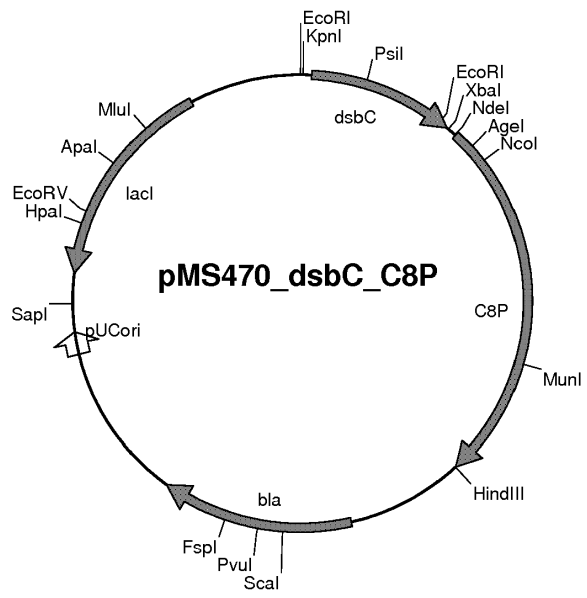


Fig. 3/6

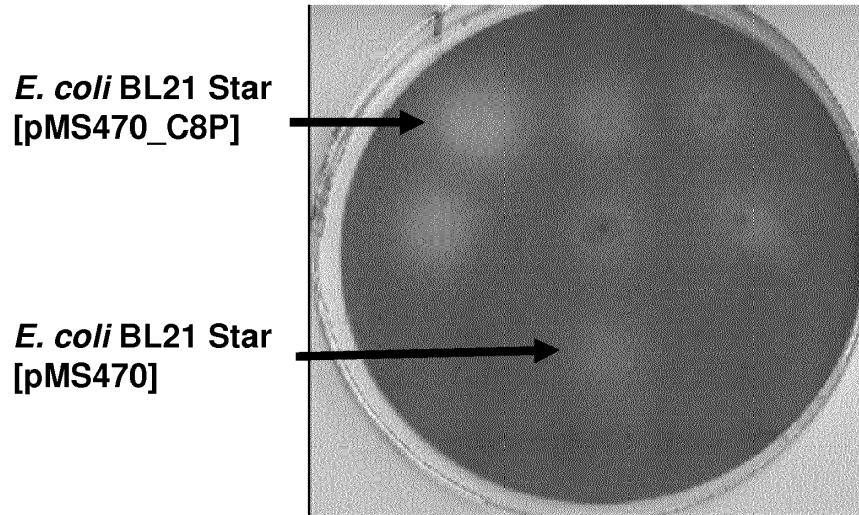


Fig. 4/6

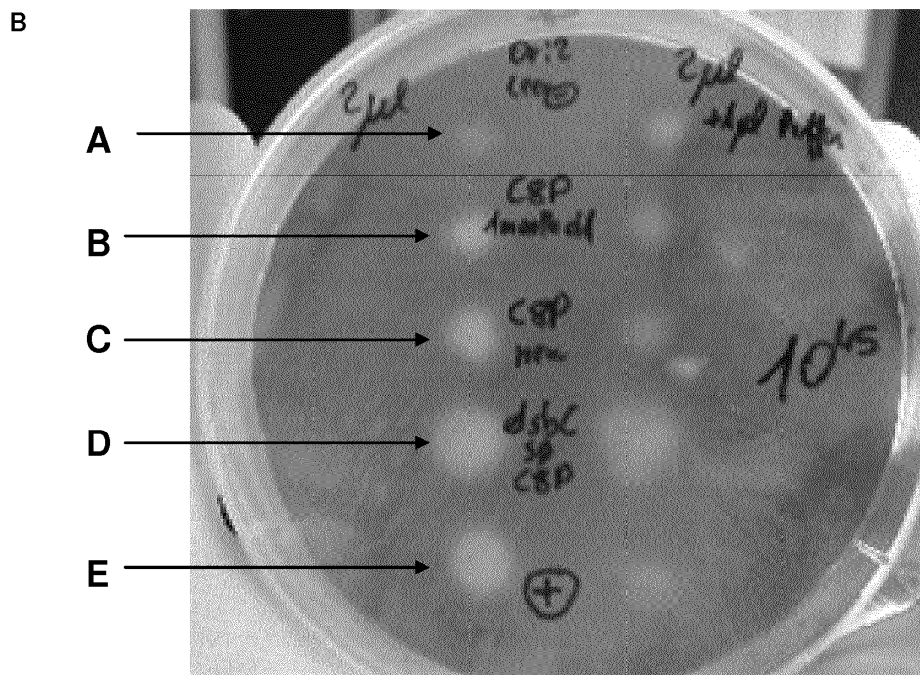
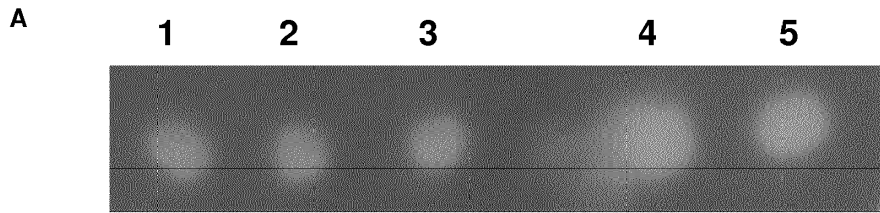
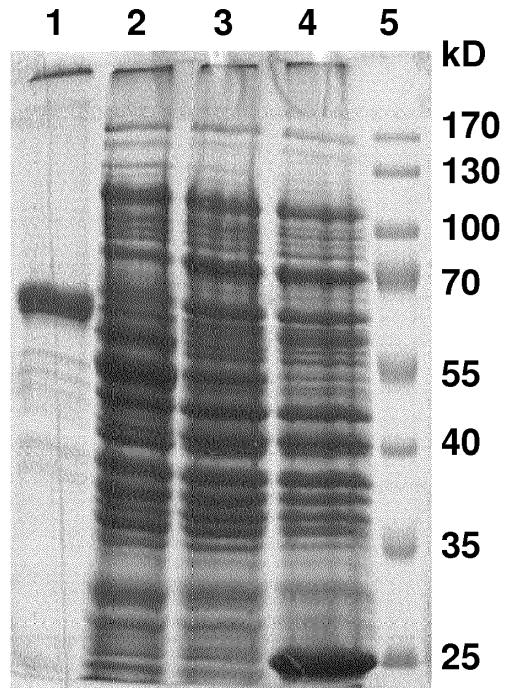


Fig. 5/6

A



B

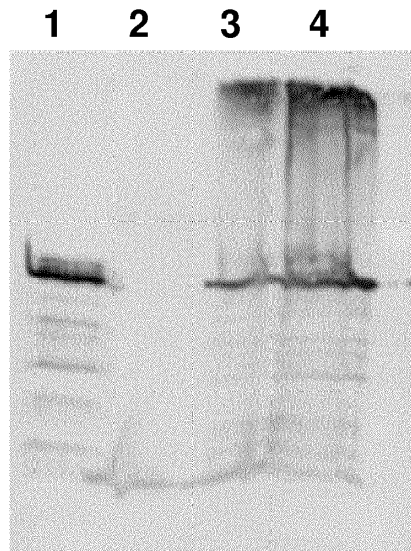


Fig. 6/6

