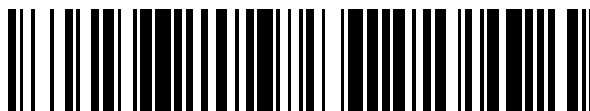


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 695**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2015 PCT/EP2015/058411**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15162064**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2015 E 15717166 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 3134519**

54 Título: **Cetorreductasas**

30 Prioridad:

22.04.2014 EP 14165444

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

19.10.2018

73 Titular/es:

**C-LECTA GMBH (100.0%)
Perlickstrasse 5
04103 Leipzig, DE**

72 Inventor/es:

**SCHMIEDEL, RAMONA;
VOGEL, ANDREAS;
KÖPKE, SABRINA;
CZAJA, RICO;
FELLER, CLAUDIA;
MERKENS, HEDDA;
RZEZNICKA, KAMILA;
PETRI, ANDREAS;
SCHWARZE, DANIEL;
STRUHALLA, MARC y
GREINER-STÖFFELE, THOMAS**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 686 695 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

Cetorreductasas

5 Las cetorreductasas (KRED, también llamadas “alcohol dehidrogenasas” ADH o “carbonil reductasas”) catalizan la reducción de aldehídos y cetonas a los correspondientes alcoholes primarios y secundarios, respectivamente. Estas enzimas también son capaces de catalizar la reacción inversa, es decir la oxidación de alcoholes primarios y secundarios a los correspondientes aldehídos y cetonas, respectivamente.

10 La reducción de cetonas a alcoholes secundarios es de gran interés para aplicaciones industriales, ya que los compuestos carbonilos pro-quirales se reducen estereoselectivamente para obtener alcoholes quirales. En algunas aplicaciones industriales, también es deseable la conversión estereoselectiva de alcoholes secundarios a cetonas para la resolución quiral de compuestos racémicos, esto es para permitir el aislamiento de enantiómeros. La oxidación enzimática de alcoholes primarios a aldehídos y la reducción enzimática de aldehídos a alcoholes primarios con frecuencia se considera de menor relevancia en aplicaciones industriales, pero también se catalizan con KRED. El uso de un mismo KRED para la reacción de oxidación o reducción, respectivamente, se puede ver influido por el ajuste del equilibrio químico de la reacción enzimática.

20 La reducción catalizada por KRED requiere un cofactor reducido como donador de electrones. Algunas KRED utilizan dinucleótidos de adenina y nicotinamida reducidos (NADH) como cofactor, otras KRED utilizan fosfatos de dinucleótido de adenina y nicotinamida reducidos (NADPH) y ciertas cetorreductasas aceptan ambos, NADH y NADPH. Por tanto, la oxidación catalizada por KRED requiere un cofactor oxidado como aceptor de electrones. Para esta reacción, las KRED utilizan el dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (NAD⁺) o fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida (NADP⁺) o ambos, NAD⁺ y NADP⁺.

25 Las KRED son enzimas ubicuas que se encuentran en todos los reinos de la vida. Las KRED bien conocidas comerciales se derivan de hígado de caballo (HLADH), levadura de pan (YADH) y bacterias, como *Thermoanaerobium brockii* (TBADH) y *Lactobacillus kefir* (LKADH).

30 Según su identidad de secuencia y sus características bioquímicas, las KRED pueden clasificarse en diferentes familias proteínicas. Los miembros pertenecientes a la familia SDR (Deshidrogenasa/Reductasa de cadena corta) tienen enzimas de cadena corta sin ningún ion metálico. Por el contrario, los miembros de la familia MDR (Deshidrogenasa/Reductasa de cadena media) tienen enzimas de cadena de tamaño dependientes de Zn²⁺. Otro grupo de KRED tiene enzimas de cadena larga que dependen de Fe²⁺ (véase K. Drauz, H. Gröger, O. May, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley VCH, Weinheim, 2012).

35 Para aplicaciones industriales, es deseable utilizar KRED de actividad y estereoselectividad altamente específica. Otro criterio importante para el uso industrial de las KRED es también su estabilidad de proceso a largo plazo, que con frecuencia se relaciona con una alta estabilidad a altas temperaturas y una gran estabilidad frente a disolventes. Si los sustratos ya son quirales, también es deseable utilizar KRED de alta estereoespecificidad.

La ingeniería enzimática permite perfeccionar enzimas. Esta técnica implica desarrollar variantes de una enzima de partida con características mejoradas (véase S. Lutz, U.T. Bornscheuer, *Protein Engineering Handbook*, Wiley VCH, Weinheim, 2009).

40 La utilización *in vitro* de KRED en procesos de reducción requiere un sistema de regeneración para el NAD(P)H. Sistemas de regeneración habituales son glucosa deshidrogenasa (GDH) o formiato deshidrogenasa, que se aplican junto con las KRED. La regeneración de cofactores también puede hacerse mediante la KRED misma, por oxidación concomitante de un cosustrato (a menudo alcoholes primarios o secundarios, por ejemplo oxidación de isopropanol a acetona). El uso concomitante de las KRED como catalizadores de reducción y sistemas de regeneración de cofactores requiere la aceptación concurrente de un ceto sustrato y el cosustrato para la regeneración de cofactores. La selección de un cosustrato específico puede depender de la actividad específica de la KRED para ese cosustrato y de la estabilidad de la KRED bajo las condiciones específicas de regeneración del cofactor.

50 Además de la reducción reversible de aldehídos, existen pocos estudios referidos a la catálisis por cetorreductasas de la oxidación de aldehídos para obtener los correspondientes ácidos. Sin embargo, esta reacción se considera más como una reacción secundaria y no como la función principal (véase K. Drauz, H. Gröger, O. May, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley VCH, Weinheim, 2012).

Ejemplos de uso industrial de las KRED para generar compuestos valiosos son la reducción de 1-fenil-2-acetona por la KRED de *Rhodococcus erythropolis*, la reducción de acetoacetato de etilo por la KRED de *Lactobacillus brevis* o la reducción de 6-benciloxi-3,5-dioxohexanoato de etilo por una KRED derivada de *Acinetobacter calcoaceticus* (véase: A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, Industrial Biotransformations, Wiley VCH, Weinheim, 2006).

Incluso aunque en la literatura se describe un gran número de KRED que catalizan reducciones asimétricas, sólo unas pocas KRED se utilizan en procesos patentados. Muchos procesos contienen cetorreductasa de *Lactobacillus kefir* (LKADH) o variantes de la misma. El documento US 8.426.178 describe un proceso para la reducción estereoselectiva de N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina a (S)-N,N-dimetil-3-hidroxi-3-(2-tienil)-1-propanoamina mediante variantes de LKADH. La US 8.512.973 describe un proceso para la reducción estereoselectiva de una acetofenona 2',6'-sustituida al correspondiente (S)-1-fenetanol sustituido mediante variantes de KRED de *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus brevis* o *Lactobacillus manor*. En la US 7.977.078 se describe un método para la reducción estereoselectiva de 3-cetotiolano a (R)-3-hidroxitiolano mediante variantes de LKADH. La US 8.617.853 describe un proceso de reducción estereoselectiva del sustrato 2-[3-[3-[2-(7-cloro-2-quinolinil)etenil]fenil]-3-oxopropil]benzoato de metilo a (S,E)-metil-2-(3-(2-(7-cloroquinolin-2-il)vinil)fenil)-3-hidroxipropil]benzoato mediante variantes de KRED de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir* o *Lactobacillus manor*. La US 8.273.554 describe un proceso para la reducción estereoselectiva de 5-((4S)-2-oxo-4-fenil(1,3-oxazolidin-3-il)-1-(4-fluorofenil)-pentano-1,5-diona a (4S)-3-[(5S)-5-(4-fluorofenil)-5-hidroxipentanoil]-4-fenil-1,3-oxazolidin-2-ona mediante variantes de LKADH. La US 6.645.746 describe un método para la reducción asimétrica de (S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo a (3R,5S)-6-cloro-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo mediante la cetorreductasa de *Candida magnolia*. La US 7.393.667 describe la preparación de 2-propanoles, como 1-[4-(4-halo-2-metil-1H-indol-5-iloxi)-5-metil-pirrol-2-il]f[1,2,4]triazin-6-iloxi]propan-2-ol mediante reducción estereoselectiva de un compuesto oxo correspondiente utilizando cetorreductasa de *Pichia angusta*. La US 8.288.131 se refiere a un método para la reducción estereoselectiva de 2-metilpentanal a (R)-2-metilpentanol mediante variantes de LKADH. La WO 2011/022548 describe un método para la conversión estereoselectiva de 1-(3-hidroxifenil)-2-(metilamino)etanona a (R)-fenilefrina mediante variantes de LKADH. En la WO 2012/046254 se describe un proceso de reducción enzimática estereoselectiva de 4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H-il)-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-ona para la preparación de (S) ó (R)-3-hidroxi-1-(3-(trifluorometil)-5,6-dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H-il)-4-(2,4,5-trifluorofenil)butan-1-ona con KRED de *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*, *Pichia methanolica* o *E. coli*. La US 8.257.952 describe variantes de LKADH capaces de reducir estereoselectivamente 2-benzamidometil-3-oxobutirato de metilo a (2R,3R)-metil-2-benzamidometil-3-hidroxibutirato. La US 7.629.157 describe variantes de cetorreductasas de *Candida magnolia* capaces de convertir estereoselectivamente 4-cloroacetoacetato de etilo en (S)-4-cloro-3-hidroxibutirato de etilo.

La EP 1 553 170 se refiere a un polipéptido formador de (R)-N-bencil-3-pirrolidinol, un polinucleótido que codifica para dicho polipéptido y su uso. Se indica que el polipéptido tiene las siguientes características físicas y químicas (1) a (4): (1) actividad: actúa sobre N-bencil-3-pirrolidinona con NADH o NADPH como coenzima para formar (R)-N-bencil-3-pirrolidinol; (2) pH óptimo para la actividad: 5,5 a 6,0; (3) temperatura óptima para la actividad: 50°C a 55°C; (4) peso molecular: alrededor de 55.000, determinado por análisis de filtración en gel, alrededor de 28.000 determinado por electroforesis en gel de poliácridamida SDS.

La base de datos de proteínas en línea ("*Database Protein online*"), nº de acceso WP_022887115, se refiere a una deshidrogenasa de cadena corta de *Glaciibacter superstes*.

Sin embargo, las cetorreductasas de la técnica anterior no son satisfactorias en todos los sentidos y existe una demanda de cetorreductasas con ventajas en comparación con las cetorreductasas convencionales, en particular en lo que se refiere a una alta estabilidad de procesado para la producción industrial de compuestos alcohólicos quirales y una buena actividad de regeneración del cofactor, respectivamente. En este sentido, la alta estabilidad de proceso en aplicaciones industriales pueden incluir una estabilidad química y física y una actividad enzimática en entornos acuosos, no acuosos y/o en sistemas bifásicos, y/o con altas concentraciones de sustrato y/o a temperaturas elevadas y/o con adición de disolventes miscibles con agua y/o un amplio rango de pH desde 4-11 y/o en soportes sólidos (es decir inmovilizadas) y/o bajo altas fuerzas de cizalladura (por ejemplo producidas por agitación, bombeo, filtración con membrana). Otros factores, como la selectividad de sustrato, K_M , la actividad específica, la estereoselectividad, estereoespecificidad, diastereoselectividad, regioselectividad, inhibición de sustrato, inhibición de producto, inhibición por otros factores, por ejemplo componentes del extracto en bruto, contaminantes del sustrato o subproductos y la capacidad de expresión soluble recombinante en un huésped adecuado pueden jugar un papel importante. Cuando el sustrato es un sustrato quiral, es decir que contiene ya uno o más centros quirales y/o ejes en sí, puede ser deseable que la estereoselectividad de la reducción enzimática de un grupo carbonilo pro-quiral contenido en dicho sustrato quiral no se vea esencialmente afectada por dicho uno o más centros quirales y/o ejes.

Un objetivo de la invención proporcionar cetorreductasas perfeccionadas.

Este problema se ha resuelto por el objeto de las reivindicaciones de la patente.

La invención proporciona nuevas cetorreductasas, en particular cetorreductasas diseñadas que muestran características mejoradas en comparación con la enzima de tipo silvestre, preferiblemente la cetorreductasa de tipo silvestre de SEQ ID NO:2.

Un primer aspecto de la invención se refiere a una cetorreductasa que comprende una secuencia de aminoácidos con una homología de al menos un 72% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

La cetorreductasa según la invención comprende esta secuencia de aminoácidos con una homología definida con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. Esto significa que la cetorreductasa según la invención puede comprender dicha secuencia de aminoácidos como una subsecuencia de su secuencia de aminoácidos completa o que la cetorreductasa según la invención puede esencialmente consistir en dicha secuencia de aminoácidos. Cuando la cetorreductasa según la invención comprende dicha secuencia de aminoácidos como una subsecuencia de su secuencia de aminoácidos completa, dicha secuencia de aminoácidos completa puede extenderse, es decir puede comprender residuos adicionales de aminoácidos en el extremo N y/o el extremo C de dicha subsecuencia. Esta extensión puede ser ventajosa, por ejemplo cuando la cetorreductasa debe inmovilizarse en un soporte sólido, por ejemplo con propósitos de purificación.

En el sentido de la invención, preferentemente la homología se calcula como identidad utilizando BLASTP (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Kinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids, Res. 25:3389-3402; Stephen F. Altschul, John C. Wootton, E. Michael Gertz, Richa Agarwala, Aleksandr Morgulis, Alejandro A. Schäffer y Yi-Kuo Yu (2005) "Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices" FEBS J. 272-5101-5109), preferiblemente utilizando la versión BLASTP 2.2.29+ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), preferiblemente utilizando los siguientes ajustes:

- Campo "Entrar Secuencia Consultada": Subrango consultado: ninguno
- Campo "Seleccionar Conjunto de Búsqueda": Base de datos: Secuencias proteínicas no redundantes (nr); parámetros opcionales: ninguno
- Campo "Selección de Programa": algoritmo: blastp (proteína-proteína BLAST).
- Parámetros de algoritmo: Campo "Parámetros Generales": Secuencias Diana Máx: 100; consultas cortas: Ajuste automático de parámetros para secuencias de entrada cortas; umbral previsto: 10; tamaño de palabra: 3; máx, de coincidencias en un rango de consultas: 0.
- Parámetros de algoritmo; Campo "Parámetros de Puntuación": Matriz: BLOSUM62; Costo del gap: Existencia: 11 Extensión 1; Ajustes de composición: Ajuste de matriz de clasificación de composición condicional.
- Parámetros de algoritmo: Campo "Filtros y enmascaramiento": Filtro: ninguno; máscara: ninguno.

Preferentemente, la cetorreductasa según la invención es capaz de reducir estereoselectivamente cetosustratos a alcoholes secundarios y/o de oxidar alcoholes secundarios a ceto-productos.

Preferentemente, las cetorreductasas según la invención son capaces de oxidar alcoholes primarios a aldehídos y/o de reducir aldehídos a alcoholes primarios.

En algunas realizaciones, las cetorreductasas según la invención son capaces de oxidar un compuesto aldehído a un ácido carboxílico.

Preferentemente, la cetorreductasa comprende una secuencia de aminoácidos con una homología de al menos un 72%, preferiblemente de al menos un 75%, o de al menos un 80% o de al menos un 82% o de al menos un 84%, con mayor preferencia de al menos un 86% o al menos un 88%, todavía con más preferencia de al menos un 90% o al menos un 91%, con especial preferencia de al menos un 92% o al menos un 93%, incluso mayor preferencia de al menos un 94% o al menos un 95%, con particular preferencia de al menos un 96% o al menos un 97% y particularmente de al menos un 98% o al menos un 99% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

Sorprendentemente se ha descubierto que las cetorreductasas según la invención tienen:

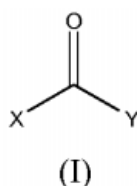
- una gran actividad
- una amplia tolerancia de sustrato
- una alta estereoselectividad
- una alta estereoespecificidad y/o

- una gran estabilidad en diferentes disolventes, opcionalmente conteniendo co-sustratos tales como isopropanol.

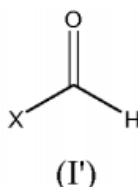
Para el propósito de la descripción, la estereoselectividad es la propiedad de una reacción química por la que un único reactivo forma una mezcla desigual de estereoisómeros durante la creación no-estereoespecífica de un nuevo estereocentro o durante la transformación no-estereoespecífica de uno previamente existente. La selectividad se produce típicamente por diferencias en efectos estéricos y electrónicos en las rutas mecanicistas que conducen a diferentes productos. Preferentemente, la conversión de un sustrato a un producto quiral bajo catálisis de la cetorreductasa según la invención proporciona el producto quiral deseado con un exceso enantiomérico de como mínimo un 50%ee, en especial como mínimo del 75%ee, con mayor preferencia como mínimo del 90%ee, todavía con mayor preferencia como mínimo del 95%ee, con especial preferencia como mínimo del 97%ee, con mayor preferencia como mínimo del 98%ee y en particular como mínimo del 99%ee.

Para el propósito de la descripción, la estereoespecificidad es la propiedad de un mecanismo de reacción que conduce a diferentes productos de reacción estereoisoméricos a partir de diferentes reactivos estereoisoméricos o que se produce solamente sobre uno (o un subconjunto) de estereoisómeros. Preferentemente, la conversión del sustrato quiral en otro producto quiral bajo catálisis de la cetorreductasa según la invención proporciona el producto quiral deseado con un exceso diastereomérico de como mínimo el 50%ed, en especial de como mínimo el 75ed, todavía con mayor preferencia como mínimo del 90%ed, con especial preferencia como mínimo del 95%ed, con particular preferencia como mínimo del 97%ed, con muy especial preferencia como mínimo del 98%ed y en particular como mínimo del 99%ed.

En una realización preferente, la cetorreductasa según la invención puede reducir preferiblemente estereoselectivamente un ceto-sustrato de fórmula general (I)



a un alcohol secundario, o la cetorreductasa según la invención es capaz de reducir preferentemente de modo estereoespecífico un sustrato aldehído de fórmula general (I')



a un alcohol primario,

donde X e Y se seleccionan, cada uno independientemente, de grupos hidrocarburo alifático o alicíclicos (C_{1-12}), saturado o insaturado, no sustituido o mono- o polisustituido; grupos hidrocarburo aromático (C_{6-10}) no sustituido o mono- o polisustituido, opcionalmente unido a la fracción CO mediante grupos hidrocarburo alifático (C_{1-12}) saturado o insaturado, no sustituido o mono- o polisustituido; grupos hidrocarburo heteroaromáticos, no sustituidos o mono- o polisustituidos, opcionalmente unidos a la fracción CO mediante grupos hidrocarburo alifático (C_{1-12}) saturados o insaturados, no sustituidos o mono- o polisustituidos; y grupos de azúcar o desoxiazúcares que comprenden en cada caso mono-, di- u oligosacáridos,

donde mono- o polisustituido significa sustituido independientemente con uno o más grupos funcionales seleccionados de -halo, -OH, =O, -O-alquilo(C_{1-12}), -O-arilo(C_{6-10}), -O-heteroarilo, -OCO-alquilo(C_{1-12}), -OCO-arilo(C_{6-10}), -OCO-heteroarilo, -SH, -S-alquilo(C_{1-12}), -S-arilo(C_{6-10}), -S-heteroarilo, -S(=O)₁₋₂OH, -NO, -NO₂, -N₃, -NH₂, -NH(alquilo(C_{1-12}))), -N(alquilo(C_{1-12}))₂, -NH(arilo(C_{6-10}))), -N(arilo(C_{6-10}))₂, -NH(heteroarilo), -N(heteroarilo)₂, -CN, -CHO, -CO₂H, CO-alquilo(C_{1-2}), -CO-arilo(C_{6-10}) y -CO-heteroarilo.

Preferentemente, X e Y se seleccionan independientemente de alquilo(C_{1-12}) no sustituido o mono- o polisustituido; arilo(C_{6-10}) no sustituido o mono- o polisustituido, opcionalmente unido a la fracción CO

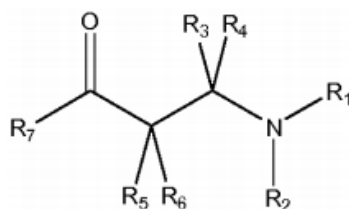
mediante grupos alquilenos(C₁₋₁₂) no sustituidos o mono- o polisustituidos; heteroarilo no sustituido o mono- o polisustituido, opcionalmente unido a la fracción CO mediante un grupo alquilenos(C₁₋₁₂) no sustituido o mono- o polisustituido; y grupos de azúcar o desoxiazúcar, en cada caso comprendiendo mono-, di- u oligosacáridos;

- 5 donde mono- o polisustituido significa sustituido independientemente con uno o más grupos funcionales seleccionados de-halo, -OH, =O, -O-alquilo(C₁₋₁₂), -O-arilo(C₆₋₁₀), -O-heteroarilo, -OCO-alquilo(C₁₋₁₂), -OCO-arilo(C₆₋₁₀), -OCO-heteroarilo, -SH, -S-alquilo(C₁₋₁₂), -S-arilo(C₆₋₁₀), -S-heteroarilo, -S(=O)₁₋₂OH, -NO, -NO₂, -N₃, -NH₂, -NH(alquilo(C₁₋₁₂)), -N(alquilo(C₁₋₁₂))₂, -NH(arilo(C₆₋₁₀)), -N(arilo(C₆₋₁₀))₂, -NH(heteroarilo), -N(heteroarilo)₂, -CN, -CHO, -CO₂H, CO-alquilo(C₁₋₂), -CO-arilo(C₆₋₁₀) y -CO-heteroarilo.
- 10 Para el propósito de la descripción, capaz de reducir preferiblemente de modo estereoselectivo un ceto-sustrato significa que, en presencia de un cofactor apropiado, bajo condiciones adecuadas (preferiblemente en agua a un pH de 7,0 y a 37°C), la cetoreductasa presenta al menos cierta actividad frente a al menos un ceto-sustrato, dando lugar a un alcohol secundario.
- 15 Para el propósito de la descripción, grupos hidrocarburo alifáticos(C₁₋₁₂) saturados o insaturados incluyen, sin limitación, alquilo, alqueno o alquino, tales como -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, CH₂CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₂CH₃, -CH₂CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CH=CH₂, -CH=CHCH=CH₂, -C≡CH y -CH=CHC=CH.
- 20 Para el propósito de la descripción, los grupos hidrocarburo alicíclicos (C₁₋₁₂) saturados o insaturados incluyen, sin limitación, cicloalquilo(C₃₋₁₂), donde 1 ó 2 átomos del anillo de carbono pueden sustituirse opcionalmente por heteroátomos seleccionados de N, O y S (heterocicloalquilo(C₁₋₁₂)).
- Para el propósito de la descripción, grupos hidrocarburo aromáticos (C₆₋₁₀) (= arilo(C₆₋₁₀)) incluyen, sin limitación, fenilo y naftilo.
- 25 Para el propósito de la descripción, los grupos hidrocarburo heteroaromáticos (= heteroarilo) incluyen, sin limitación, sistemas de anillo monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. Ejemplos de heteroarilos monocíclicos incluyen, sin limitación, acetidinilo, acepanilo, aziridinilo, diazepinilo, 1,3-dioxolanilo, dioxanilo, ditianilo, furilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolilo, isotiazolinilo, isotiazolidinilo, isoxazolilo, isoxazolinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, oxadiazolilo, oxadiazolinilo, oxadiazolidinilo, oxazolilo, oxazolinilo, oxazolidinilo, piperazinilo, piperidinilo, piranilo, pirazinilo, pirazolilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, piridinilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirrolilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrazinilo, tetrazolilo, tiadiazolilo, tiadiazolinilo, tiadiazolidinilo, tiazolilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, tienilo, tiomorfolinilo, 1,1-dioxidotiomorfolinilo (tiomorfolinsulfona), tiopiranilo, triazinilo, triazolilo y tritiano. Ejemplos de heteroarilos bicíclicos incluyen, sin limitación, benzimidazolilo, benzodioxinilo, benzotiazolilo, benzotienilo, benzotriazolilo, benzoxazolilo, benzofuranilo, benzopiranilo, benzotiopiranilo, cinnolinilo, indazolilo, indolilo, 2,3-dihidroindolilo, indolizínilo, naftiridinilo, isobenzofuranilo, isobenzotienilo, isoindolilo, isoquinolinilo, ftalazinilo, 4H-pirido(1,2-a)pirimidin-4-ona, piranopiridinilo, quinolinilo, quinolizínilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahydroquinolinilo y tiopiranopiridinilo. Ejemplos de heteroarilos tricíclicos incluyen, sin limitación, acridinilo, carbozolilo, carbolinilo, dibenzo(b,d)furanilo, dibenzo(b,d)tienilo, nafto(2,3-b)furanilo, nafto(2,3-b)tienilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, tiatrenilo, tioxantenilo y xantenilo.
- 30
- 35
- 40 Para el propósito de la descripción, mono- o polisustituido con relación con alquilo (por ejemplo -alquilo(C₁₋₁₂)), cicloalquilo (por ejemplo -cicloalquilo(C₃₋₈)), arilo (por ejemplo -arilo(C₆₋₁₀)) y heteroarilo respectivamente, preferentemente independientemente, significan el reemplazo de un hidrógeno del núcleo por uno o más grupos funcionales seleccionados entre -halo (preferiblemente -F, -Cl, -Br, -I), -OH, =O, -O-alquilo(C₁₋₁₂), -O-arilo(C₆₋₁₀), -O-heteroarilo, -OCO-alquilo(C₁₋₁₂), -OCO-arilo(C₆₋₁₀), -OCO-heteroarilo, -SH, -S-alquilo(C₁₋₁₂), -S-arilo(C₆₋₁₀), -S-heteroarilo, -S(=O)₁₋₂OH, -NO, -NO₂, -N₃, -NH₂, -NH(alquilo(C₁₋₁₂)), -N(alquilo(C₁₋₁₂))₂, -NH(arilo(C₆₋₁₀)), -N(arilo(C₆₋₁₀))₂, -NH(heteroarilo), -N(heteroarilo)₂, -CN, -CHO, -CO₂H, CO-alquilo(C₁₋₂), -CO-arilo(C₆₋₁₀) y -CO-heteroarilo.
- 45
- 50 Para el propósito de la descripción, grupos de azúcar o desoxiazúcar, que comprenden en cada caso mono-, di- u oligosacáridos, significan que el sustrato ceto de fórmula general (I) o el sustrato aldehído de fórmula general (I') pueden ser un compuesto polihidroxicarbonilo, opcionalmente unido a otros compuestos polihidroxicarbonilo mediante enlaces acetal y/o cetal. Por ejemplo, cuando X es un alquilo(C₁) monosustituido con -OH e Y es un alquilo(C₂) polisustituido con -OH, donde cada átomo de carbono lleva un único sustituyente -OH, el sustrato ceto de fórmula general (I) es una cetotetrosa que comprende ambos enantiómeros, D-eritrosa y L-eritrosa. De modo análogo, el sustrato ceto de fórmula general (I) puede ser una cetopentosa o una cetoheptosa, que a su vez pueden estar unidas a otros grupos de azúcar formando así
- 55 disacáridos u oligosacáridos. Correspondientemente, cuando X es un alquilo(C₂) polisustituido con -OH, donde cada átomo de carbono lleva un solo sustituyente -OH, el sustrato aldehído de fórmula general (I') es

una aldotriosa que comprende ambos enantiómeros, D-glicerinaldehído y L-glicerinaldehído. De modo análogo, el sustrato aldehído de fórmula general (I') puede ser una aldotetrosa, aldopentosa o una aldohexosa, que a su vez pueden estar unidas a otros residuos de azúcar formando así disacáridos u oligosacáridos.

- 5 En una realización preferente, la cetorreductasa según la invención es capaz de reducir estereoselectivamente un sustrato ceto seleccionado del grupo consistente en:

i) derivados de 3-aril-3-cetopropanoamina de acuerdo con la fórmula general (II)



(II)

donde

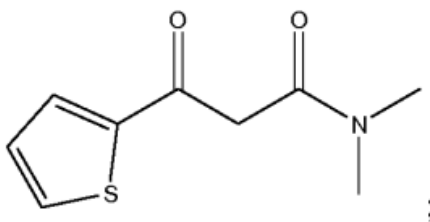
- 10 R₁ y R₂ se seleccionan, cada uno independientemente, del grupo consistente en -H; -alquilo(C₁₋₁₂) no sustituido o mono- o polisustituido; -cicloalquilo(C₃₋₈) no sustituido o mono- o polisustituido; -arilo(C₆₋₁₀) no sustituido o mono- o polisustituido, opcionalmente unido a través un grupo hidrocarburo alifático(C₁₋₁₂) saturado o insaturado, no sustituido o mono- o polisustituido; o heteroarilo no sustituido o mono- o polisustituido, opcionalmente unido mediante un grupo hidrocarburo alifático(C₁₋₁₂) saturado o insaturado, no sustituido o mono- o polisustituido, donde

R₁ y R₂, junto con el átomo de nitrógeno al que están conectados, forman un anillo heterocicloalquilo(C₂₋₈) no sustituido o mono- o polisustituido o un anillo heteroarilo no sustituido o mono- o polisustituido; preferiblemente, R₁ y R₂ son alquilo(C₁₋₁₂), con mayor preferencia -CH₃;

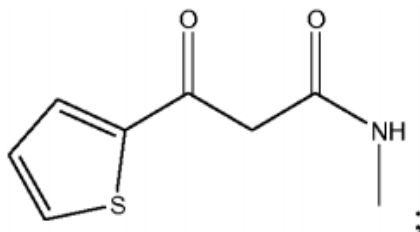
- 20 R₃, R₄, R₅ y R₆ se seleccionan, cada uno independientemente, de -H; alquilo(C₁₋₁₂) no sustituido o mono- o polisustituido; o donde R₃ y R₄ juntos son =O; preferentemente R₃ y R₄ juntos son =O, y R₅ y R₆ son -H; y

R₇ es arilo(C₆₋₁₀) no sustituido o mono- o polisustituido; o -heteroarilo no sustituido o mono- o polisustituido; preferentemente R₇ es un heteroarilo no sustituido o mono- o polisustituido; con mayor preferencia un heteroarilo no sustituido; en especial tienilo; en particular 2-tienilo;

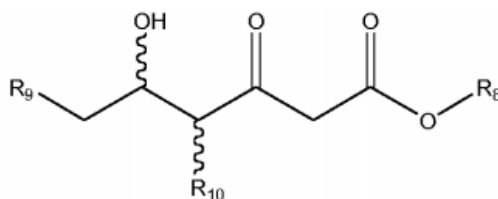
- 25 donde un sustrato ceto particularmente preferente de este tipo es N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina



donde otro sustrato ceto de este tipo particularmente preferente es N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina



- 30 ii) derivados de 5-hidroxi-3-oxohexanoato de acuerdo con la fórmula general (III)



(III)

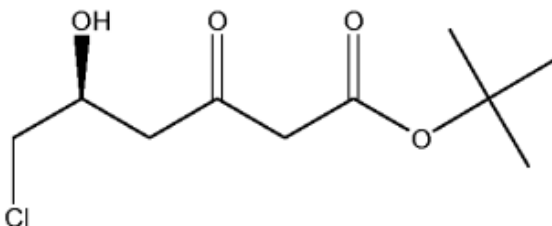
donde

5 R₆ es -alquilo(C₁₋₁₂) no sustituido o mono- o polisustituido; o -arilo(C₆₋₁₀) no sustituido o mono- o polisustituido, opcionalmente unido a un grupo hidrocarburo alifático(C₁₋₁₂) saturado o insaturado, no sustituido o mono- o polisustituido; preferiblemente R₈ es -alquilo(C₁₋₁₂), con mayor preferencia -C(CH₃)₃;

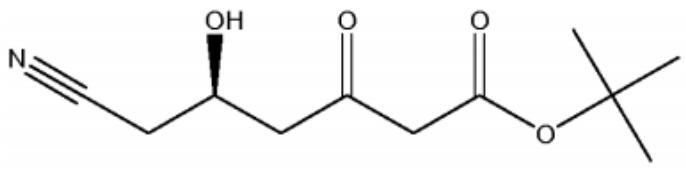
R₉ es -H; -halo (preferiblemente cloro, bromo, yodo); -CN; u OR₁₁, donde R₁₁ es hidrógeno o un grupo protector (como benzilo); preferiblemente R₉ es -halo ó -CN; con mayor preferencia -Cl ó -CN;

10 R₁₀ es -H; -alquilo(C₁₋₁₂) no sustituido o mono- o polisustituido, o -arilo(C₆₋₁₀) no sustituido o mono- o polisustituido, opcionalmente unido a un grupo hidrocarburo alifático(C₁₋₁₂) saturado o insaturado, no sustituido o mono- o polisustituido; preferentemente R₁₀ es -H;

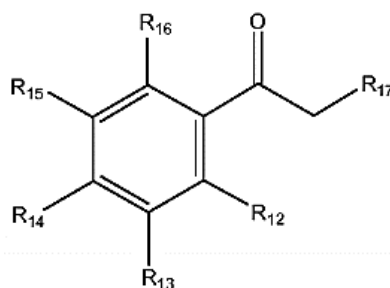
donde un sustrato ceto de este tipo particularmente preferente es (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo



15 donde un sustrato ceto de este tipo particularmente preferente es (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo



iii) derivados de acetofenona de acuerdo con la fórmula general (IV)



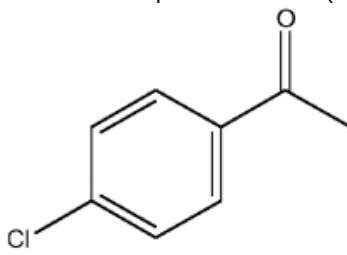
(IV)

donde

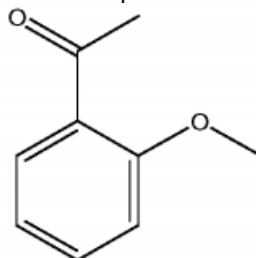
20 R₁₂, R₁₃, R₁₄, R₁₅ y R₁₆ se seleccionan independientemente del grupo consistente en -H; -halo (preferiblemente cloro, bromo e yodo); -alquilo(C₁₋₁₂) no sustituido o mono- o polisustituido; -arilo(C₆₋₁₀) no sustituido o mono- o polisustituido opcionalmente unido a través de un grupo hidrocarburo alifático(C₁₋₁₂) saturado o insaturado, no sustituido o mono- o polisustituido; -heteroarilo no sustituido o mono- o polisustituido, opcionalmente unido a través de un grupo hidrocarburo alifático(C₁₋₁₂) saturado o insaturado,

no sustituido o mono- o polisustituido; y -OR₁₈, donde R₁₈ es -H, -alquilo(C₁₋₁₂) no sustituido o mono- o polisustituido o -arilo(C₆₋₁₀) no sustituido o mono- o polisustituido opcionalmente unido a través de un grupo hidrocarburo alifático(C₁₋₁₂) saturado o insaturado, no sustituido o mono o polisustituido; preferentemente R₁₂, R₁₃, R₁₄, R₁₅ y R₁₆ son, independientemente, -H, -halo u OR₁₈; en especial -H, -Cl u OCH₃;

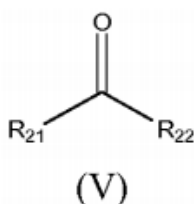
- 5 R₁₇ es -H, -halo (preferiblemente cloro, bromo e yodo); -alquilo(C₁₋₁₂) no sustituido o mono o polisustituido; -arilo(C₆₋₁₀) no sustituido o mono- o polisustituido, opcionalmente unido a través de un grupo hidrocarburo alifático(C₁₋₁₂) saturado o insaturado, no sustituido o mono- o polisustituido; heteroarilo no sustituido o mono- o polisustituido, opcionalmente unido a través de un grupo hidrocarburo alifático(C₁₋₁₂) saturado o insaturado, no sustituido o mono- o polisustituido; -OR₁₉, -NH₂, -NHR₁₉ o NR₁₉R₂₀, donde R₁₉ y R₂₀ se seleccionan en
 10 cada caso independientemente de entre -alquilo(C₁₋₁₂) no sustituido o mono- o polisustituido; -arilo(C₆₋₁₀) no sustituido o mono- o polisustituido, opcionalmente unido a través de un grupo hidrocarburo alifático(C₁₋₁₂) saturado o insaturado, no sustituido o mono- o polisustituido; o heteroarilo no sustituido o mono- o polisustituido, opcionalmente unido a través de un grupo hidrocarburo alifático(C₁₋₁₂) saturado o insaturado, no sustituido o mono- o polisustituido; preferentemente R₁₇ es -H;
- 15 donde un sustrato ceto de este tipo particularmente preferente es 1-(4-clorofenil)etanona,



o donde un sustrato ceto de este tipo particularmente preferente es 1-(2-metoxifenil)etanona



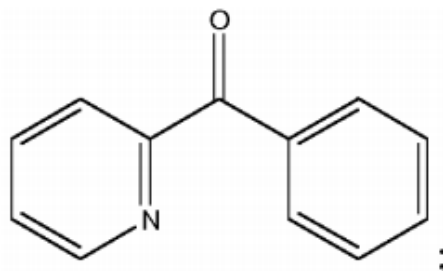
iv) derivados de benzoilo de acuerdo con la fórmula general (V)



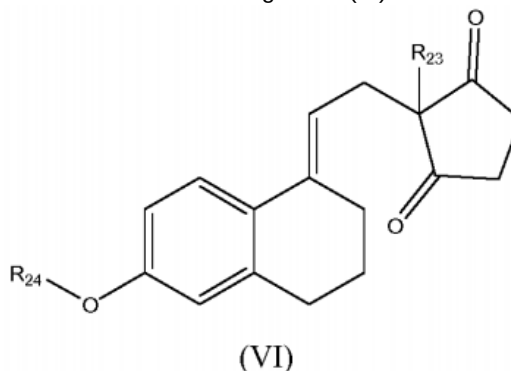
- 20 donde

R₂₁ y R₂₂ se seleccionan independientemente entre arilo(C₆₋₁₀) no sustituido o mono- o polisustituido y heteroarilo no sustituido o mono- o polisustituido; preferentemente R₂₁ es -arilo(C₆₋₁₀) no sustituido o mono- o polisustituido y R₂₂ es heteroarilo no sustituido o mono- o polisustituido; con mayor preferencia R₂₁ es -arilo(C₆₋₁₀) no sustituido y R₂₂ es heteroarilo no sustituido;

donde un sustrato ceto de este tipo particularmente preferente es fenil-(2-piridil)-metanona



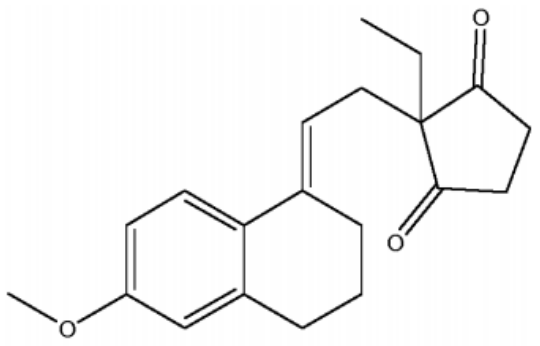
v) derivados de secodiona de acuerdo con la fórmula general (VI)



donde

- 5 R_{23} y R_{24} se seleccionan independientemente del grupo consistente en -H y alquilo(C_{1-12}); y preferentemente R_{23} es $-CH_2CH_3$ y R_{24} es alquilo(C_{1-12}); en especial R_{23} es $-CH_2CH_3$ y R_{24} es $-CH_3$;

donde un sustrato ceto de este tipo particularmente preferente es etilsecodiona (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14,17-diona).



10

- vi) 3-quinuclidona (es decir 1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona);
vii) 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo;
viii) 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo y
ix) Cetosa, preferiblemente cetotetrosa, cetopentosa o cetoheptosa;

- 15 o la cetorreductasa según la invención es capaz de reducir preferiblemente de modo estereoespecífico un sustrato aldehído seleccionado del grupo consistente en
x) 2-butanal (sinónimo de isobutiraldehído) (debido a que este sustrato ceto es un aldehído no-proquiral, la reducción no se produce de modo estereoselectivo); y
xi) 1-heptanal (debido a que este sustrato ceto es un aldehído no proquiral, la reducción no se produce de modo estereoselectivo);
- 20

donde en cada caso mono- o polisustituido significa sustituido independientemente con uno o más grupos funcionales seleccionados de -halo, -OH, -O-alquilo(C_{1-12}), -O-arilo(C_{6-10}), -O-heteroarilo, -OCO-alquilo(C_{1-12}), -OCO-arilo(C_{6-10}), -OCO-heteroarilo, -SH, -S-alquilo(C_{1-12}), -S-arilo(C_{6-10}), -S-heteroarilo, $-S(=O)_{1-2}OH$, -NO, -

NO₂, -N₃, -NH₂, -NH(alquilo(C₁₋₁₂)), -N(alquilo(C₁₋₁₂))₂, -NH(arilo(C₆₋₁₀)), -N(arilo(C₆₋₁₀))₂, -NH(heteroarilo), -N(heteroarilo)₂, -CN, -CHO, -CO₂H, CO-alquilo(C₁₋₂), -CO-arilo(C₆₋₁₀) y -CO-heteroarilo.

- En algunas realizaciones de la invención, las cetorreductasas según la invención son capaces de reducir sustratos aldehído o capaces de reducir preferiblemente de modo estereoselectivo sustratos ceto de acuerdo con las fórmulas generales (I) a (VI), o 3-quinuclidona o 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo, 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo, 2-butanal o 1-heptanal, según se define más arriba, para obtener los respectivos alcoholes primarios o secundarios. En algunas realizaciones de la invención, las cetorreductasas según la invención son capaces de oxidar sustratos aldehído, por ejemplo 2-butanal o 1-heptanal, para obtener los correspondientes ácidos carboxílicos.
- 5 En algunas realizaciones, las cetorreductasas según la invención son capaces de reducir estereoselectivamente derivados de 3-aril-3-cetopropanoamina de acuerdo con la fórmula general (II), preferiblemente N,N-dimetil-3-ceto-(2-tienil-1-cetopropanoamina a preferentemente (1S)-3-(dimetilamino)-1-(2-tienil)propan-1-ol. Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 62, 72, 85, 86, 87, 88 u 89; preferiblemente las SEQ ID NO: 55, 58 u 87 y con mayor preferencia la SEQ ID NO: 58.
- 10 En algunas realizaciones, las cetorreductasas según la invención son capaces de reducir estereoselectivamente derivados de 3-aril-3-cetopropanoamina de acuerdo con la fórmula general (II), preferiblemente N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina, para obtener preferiblemente (1S)-3-(metilamino)-1-(2-tienil)propan-1-ol. Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 19, 28, 40, 46, 47, 49, 50, 55, 56, 57, 58, 59, 62, 64, 67, 72, 81, 82, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 92 o 93, preferiblemente las SEQ ID NO: 58, 87 o 92 y con de mayor preferencia la SEQ ID NO: 87.
- 15 En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoselectivamente derivados de 5-hidroxi-3-oxohexanoato de acuerdo con la fórmula general (III), de preferencia (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, para obtener preferiblemente (3R,5S)-6-cloro-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo. Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 34, 36, 40, 49, 53, 54, 55, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 92, o 93, preferiblemente las SEQ ID NO: 62, 91 o 92 y con mayor preferencia la SEQ ID NO: 91.
- 20 En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoselectivamente derivados de 5-hidroxi-3-oxohexanoato de acuerdo con la fórmula general (III), de preferencia (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, para obtener preferiblemente (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo. Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 34, 36, 40, 49, 55, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 84, 92 o 93, preferiblemente las SEQ ID NO: 62, 91 o 92 y con mayor preferencia la SEQ ID NO: 91.
- 25 En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoselectivamente derivados de acetofenona de acuerdo con la fórmula general (IV), de preferencia 1-(4-clorofenil)etanona para obtener 1-(4-clorofenil)etanol. Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 7, 9, 12, 15, 17, 18, 23, 24, 28, 31, 36, 38, 39, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 62, 72, 81, 82, 83, 87 o 92, preferiblemente las SEQ ID NO: 7, 15 o 28 y con mayor preferencia la SEQ ID NO: 28.
- 30 En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoselectivamente derivados de acetofenona de acuerdo con la fórmula general (IV), preferiblemente 1-(2-metoxifenil)etanona a 1-(2-metoxifenil)etanol. Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 15, 17, 22, 24, 26, 36, 38, 40, 58, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 86, 92 o 93, preferiblemente las SEQ ID NO: 17, 72 o 92 y con mayor preferencia la SEQ ID NO: 72.
- 35 En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoselectivamente derivados de benzoilo de acuerdo con la fórmula general (V), de preferencia fenil-(2-piridil)-metanona a fenil-(2-piridil)-metanol. Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 21, 24, 28, 36, 38, 39, 40, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 92 o 93, preferiblemente las SEQ ID NO: 72, 82 o 92, con mayor preferencia la SEQ ID NO: 72.
- 40 En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoselectivamente derivados de benzoilo de acuerdo con la fórmula general (V), de preferencia fenil-(2-piridil)-metanona a fenil-(2-piridil)-metanol. Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 21, 24, 28, 36, 38, 39, 40, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 92 o 93, preferiblemente las SEQ ID NO: 72, 82 o 92, con mayor preferencia la SEQ ID NO: 72.
- 45 En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoselectivamente derivados de benzoilo de acuerdo con la fórmula general (V), de preferencia fenil-(2-piridil)-metanona a fenil-(2-piridil)-metanol. Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 21, 24, 28, 36, 38, 39, 40, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 92 o 93, preferiblemente las SEQ ID NO: 72, 82 o 92, con mayor preferencia la SEQ ID NO: 72.
- 50

- En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoselectivamente derivados de secodiona de acuerdo con la fórmula general (VI), de preferencia etilsecodiona (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14,17-diona) a preferiblemente etilseconol (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14-ona-17-β-ol). Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 61, 62, 65, 66, 69, 70, 71, 75, 78, 82, 83, 86, 92 o 93, preferiblemente las SEQ ID NO: 69, 70 o 71 y con mayor preferencia la SEQ ID NO: 70.
- En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoselectivamente el sustrato ceto 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo para obtener 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo. Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 17, 34, 36, 40, 46, 47, 52, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 25, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 84, 92 o 93, preferiblemente las SEQ ID NO: 46, 76 o 78 y con mayor preferencia la SEQ ID NO: 76.
- En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoselectivamente el sustrato ceto 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo para obtener preferiblemente (3S)-4-cloro-3-hidroxibutanoato de etilo. Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 2, 63 o 90.
- En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoselectivamente el sustrato ceto 3-quinuclidona (sinónimo de clorhidrato de 1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona) a 3-quinuclidinol (sinónimo de 1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ol). Ejemplos de tales cetorreductasas comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 17, 21, 26, 38, 40, 62, 72, 73, 81, 83, 86, 92 o 93, preferiblemente las SEQ ID NO: 17, 21 o 73, con mayor preferencia la SEQ ID NO: 17.
- En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de oxidar un alcohol secundario para obtener la correspondiente cetona, por ejemplo oxidar 2-butanol a 2-butanal.
- En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de oxidar un alcohol primario para obtener un compuesto aldehído, por ejemplo oxidar 1-heptanol a 1-heptanal.
- En algunas realizaciones, las cetorreductasas de acuerdo con la invención son capaces de oxidar un compuesto aldehído para obtener un ácido carboxílico.
- Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención es capaz de oxidar un cosustrato para regenerar cofactores con una alta actividad específica, preferiblemente una actividad específica de 0,1-100 U/mg, en especial 1-50 U/mg, y con mayor preferencia 10-12 U/mg de liofilizado de cetorreductasa. Cosustratos en el sentido de la invención son alcoholes primarios o secundarios convertidos (preferiblemente oxidados) por una cetorreductasa de acuerdo con la invención concomitantemente a la conversión (preferiblemente reducción) de un sustrato ceto.
- Cosustratos adecuados previstos para la regeneración de cofactores pueden seleccionarse según su actividad específica preferiblemente del grupo consistente en isopropanol, 2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol y 2-heptanol. Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención convierte el isopropanol en acetona con una alta actividad específica. Un liofilizado de cetorreductasa se puede obtener, por ejemplo, mediante disrupción celular según se describe en el ejemplo 2 (véase más abajo) y liofilización subsiguiente del extracto bruto.
- Para determinar la actividad de oxidación en relación a un cosustrato dado, la cetorreductasa de acuerdo con la invención se incubaba, preferentemente en una solución tampón que contiene un 20% del cosustrato, por ejemplo isopropanol y un cofactor, por ejemplo 0,25 mM de NAD(P), a 30°C. La actividad de oxidación se determina midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm que resulta de la reducción de NAD(P). La cetorreductasa con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 tiene, bajo las condiciones específicas, una actividad específica de 10,5 U/mg de liofilizado de cetorreductasa para la oxidación en isopropanol.
- Preferentemente, las cetorreductasas de acuerdo con la invención tienen una alta estabilidad en los cosustratos, de preferencia en isopropanol, 2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol y/o 2-heptanol. Preferiblemente después de 48h de incubación previa de la cetorreductasa a 30°C en un cosustrato acuoso al 50%, isopropanol, la cetorreductasa tiene una actividad residual de al menos un 1%, preferiblemente al menos un 10% o al menos un 20%, todavía más preferiblemente al menos del 30% o al menos del 40%, todavía con más preferencia de al menos un 50% o al menos un 60%, incluso con más preferencia de al menos un 70% o al menos un 80%, o con mayor preferencia de al menos un 85% o al menos un 90%, particularmente de al menos un 95% o al menos un 99%, con relación a la actividad antes de la incubación previa. A este respecto,

la actividad residual en el sentido de esta invención describe la actividad residual cetorreductasa de una enzima después de la incubación previa con un cosustrato en comparación con la actividad después de la incubación previa sin el cosustrato. Para determinar la estabilidad en el cosustrato, incluyendo por ejemplo isopropanol, la cetorreductasa de acuerdo con la invención se incubaba previamente en una disolución tampón, preferentemente a pH 9, conteniendo un 50% del cosustrato, por ejemplo isopropanol, a 30°C, durante 48 h, y la actividad enzimática de la cetorreductasa se compara con una enzima previamente incubada sin el cosustrato. La actividad residual de la cetorreductasa de acuerdo con la invención es del 100% cuando ambas actividades enzimáticas son idénticas: es decir, cuando no hay pérdida de actividad si se compara con la actividad con incubación previa sin cosustrato. En las condiciones descritas, la cetorreductasa con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 muestra una actividad residual del 100%.

Una conversión eficiente de cosustratos por la cetorreductasa y la estabilidad de cetorreductasa en el cosustrato son de relevancia particular para la configuración de procesos industriales eficientes de reducción de sustratos ceto o aldehído con el fin de obtener alcoholes secundarios o primarios. La estabilidad de la cetorreductasa de la invención en un cosustrato y su capacidad de conversión de cosustratos de acuerdo con la invención también es relevante para la conversión inversa de alcoholes primarios y secundarios en sustrato ceto y aldehído.

En algunas realizaciones, la cetorreductasa de acuerdo con la invención muestra una mejor actividad específica, estabilidad térmica y/o estereoselectividad con el diseño de la SEQ ID NO:2.

Una mejor actividad específica de acuerdo con la invención se refiere a una actividad específica de una cetorreductasa diseñada por ingeniería que es mayor que la actividad específica de cetorreductasa no diseñada. Preferentemente, la actividad específica es como mínimo del 10%, como mínimo del 50%, como mínimo del 100%, como mínimo 1,5 veces, como mínimo 2 veces, como mínimo 3 veces, como mínimo 5 veces, como mínimo 10 veces, como mínimo 20 veces, como mínimo 50 veces, como mínimo 100 veces, como mínimo 200 veces, como mínimo 300 veces, como mínimo 500 veces, como mínimo 700 veces, como mínimo 1000 veces, como mínimo 10.000 veces, como mínimo 100.000 veces mayor que la actividad específica de la cetorreductasa no diseñada. La actividad específica mejorada puede significar también que la cetorreductasa diseñada por ingeniería muestra una actividad determinada hacia el sustrato deseado, mientras que la cetorreductasa no diseñada no tiene una actividad significativa con dicho sustrato.

Una estabilidad térmica mejorada de acuerdo con la invención se refiere a una mayor actividad específica residual de una cetorreductasa de diseño por ingeniería después de una incubación de 48 h a 30°C en comparación con la cetorreductasa no diseñada de SEQ ID NO:2. Alternativamente una estabilidad térmica mejorada de acuerdo con esta invención se puede referir a la misma actividad específica residual de una cetorreductasa diseñada en comparación con la cetorreductasa no diseñada después de su incubación a una temperatura mayor o durante un tiempo más largo a la misma temperatura.

Una mejor estereoselectividad de acuerdo con la invención se refiere a un exceso enantiomérico del producto proporcionado mediante una cetorreductasa diseñada por ingeniería que es mayor que el exceso enantiomérico del producto proporcionado por la cetorreductasa no diseñada de SEQ ID NO:2. El exceso enantiomérico proporcionado por una cetorreductasa diseñada por ingeniería aumenta preferiblemente en como mínimo un 0,1% ee, como mínimo un 0,5% ee, como mínimo un 1% ee, como mínimo un 2% ee, como mínimo un 3% ee, como mínimo un 5% ee, como mínimo un 7% ee, como mínimo un 10% ee, como mínimo un 20% ee, como mínimo un 30% ee, como mínimo un 40% ee, como mínimo un 50% ee, como mínimo un 60% ee, como mínimo un 70% ee, como mínimo un 80% ee, como mínimo un 90% ee, como mínimo un 95% ee, como mínimo un 97% ee, como mínimo un 98% ee, o como mínimo un 99% ee, en comparación con la cetorreductasa no diseñada. La estereoselectividad mejorada también puede significar que la cetorreductasa diseñada por ingeniería tiene una cierta estereoselectividad hacia el producto quiral deseado, mientras que la cetorreductasa no diseñada no tiene ninguna estereoselectividad significativa hacia dicho producto quiral.

Preferentemente, la actividad específica mejorada de la cetorreductasa diseñada por ingeniería comparada con la cetorreductasa no diseñada de SEQ ID NO:2 se determina bajo condiciones de reacción normalizadas, típicamente a 30°C, en una solución tampón acuosa que contiene el sustrato, el cofactor, suplementos opcionales y cetorreductasa. Preferentemente, la solución tampón se selecciona del grupo consistente en 10-200 mM Tris/HCl pH 7-9 que contiene 2 mM de MgCl₂, 10-200 mM de fosfato sódico/NaOH pH de 6-8, ó 10-200 mM de trietanolamina/HCl pH 7-9. Preferentemente, el cofactor NADH se añade a una concentración final de entre 0,05 y 10 mM. El sustrato, que se añade preferiblemente a una concentración final entre 5 mM y 1M, preferentemente se selecciona del grupo consistente en 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo, 1-(4-clorofenil)etanona, 1-(2-metoxifenil)etanol, (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina, etilsecodiona (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14,17-diona), (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo y N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina, fenil-(2-piridil)-metanona, 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo, 3-quinuclidona, 2-butanal y 1-

heptanal. Otros suplementos opcionales se seleccionan preferentemente del grupo consistente en 1-5% Triton™ X-100 (v/v) y 0,5 a 10% de DMSO (v/v). La cetorreductasa se añade, preferiblemente, como un extracto bruto sobrenadante. El extracto bruto se obtiene rompiendo el huésped de expresión que contiene la cetorreductasa y centrifugado subsiguiente para separar los desechos celulares y el sobrenadante del extracto bruto que contiene la cetorreductasa. La actividad específica se determina, de preferencia, midiendo la formación del producto, agotamiento del cofactor NADH reducido y/o agotamiento del sustrato. En caso de que la actividad específica se determine midiendo la formación del producto o agotamiento del sustrato, se puede aplicar un sistema de regeneración del cofactor (isopropanol o GDH/glucosa) en la reacción estándar. No se aplica ningún sistema de regeneración del cofactor en caso de que la actividad específica se determine midiendo el agotamiento del cofactor NADH reducido. En caso de aplicarse un sistema de regeneración del cofactor, se puede sustituir el cofactor NADH reducido por el cofactor NAD⁺ oxidado, que es reducido por el sistema de regeneración del cofactor.

La estereoselectividad mejorada de la cetorreductasa diseñada por ingeniería comparada con la cetorreductasa no diseñada por ingeniería de SEQ ID NO:2 se determina preferiblemente bajo condiciones de reacción estándar según se describe más arriba para la determinación de la actividad específica mejorada. Se aplica una analítica quiral para analizar el producto formado en la reacción.

La mejor estabilidad térmica de la cetorreductasa diseñada por ingeniería comparada con la cetorreductasa no diseñada por ingeniería de SEQ ID NO:2, se determina preferentemente incubando la cetorreductasa que contiene el extracto bruto durante 15 minutos a una temperatura dada (preferiblemente la temperatura a la que la cetorreductasa no diseñada por ingeniería de SEQ ID NO:2 muestra una actividad residual del 10%) en un ciclador PCR. A continuación se incuba el extracto bruto sobre hielo durante 30 minutos. Se separan las proteínas no solubles por centrifugado y el sobrenadante se analiza en cuanto a su actividad residual de cetorreductasa en un ensayo estándar de cetorreductasa. En este ensayo estándar se oxida un sustrato apropiado para la cetorreductasa, por ejemplo isopropanol, por ejemplo para obtener acetona, mediante la cetorreductasa, con la reducción concomitante de NAD⁺ a NADH (ya que ningún otro sustrato de cetorreductasa está presente en este ensayo estándar, isopropanol funciona como sustrato para la cetorreductasa y no se aplica para la regeneración del cofactor). El aumento de NADH se controla midiendo la absorción a 340 nm en un fotómetro estándar. El ensayo se realiza bajo condiciones de reacción estándar, es decir típicamente a 30°C en una solución tampón acuosa que contiene el sustrato (por ejemplo isopropanol), el cofactor y la cetorreductasa. Preferiblemente, la cetorreductasa se añade como sobrenadante del extracto bruto. El extracto bruto se obtiene rompiendo el huésped de expresión que contiene la cetorreductasa y subsiguiente centrifugado para separar los desechos celulares y el sobrenadante del extracto bruto que contiene la cetorreductasa. La solución tampón preferentemente se selecciona del grupo consistente en 10-200 mM de tris/HCl pH 7-9 que contiene 2 mM de MgCl₂, 10-200 mM de fosfato sódico/NaOH pH 6-9 o 10-200 mM de trietanolamina/HCl pH 7-9.

Preferentemente, el cofactor NAD⁺ se añade a una concentración final de 0,05 a 10 mM. La cetorreductasa se añade preferentemente al sobrenadante del extracto bruto. El extracto crudo se obtiene rompiendo el huésped de expresión que contiene la cetorreductasa y centrifugando entonces para separar los desechos celulares y el sobrenadante del extracto bruto que contiene la cetorreductasa.

En una realización preferente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería de acuerdo con la invención difiere del tipo silvestre de cetorreductasa de SEQ ID NO: 2 en 1 a 70 aminoácidos, típicamente en 1 a 50 aminoácidos, más típicamente en 1 a 30 aminoácidos, incluso todavía más típicamente en 1 a 20 aminoácidos y en particular típicamente en 1 a 11 aminoácidos.

E este respecto, ingeniería significa que uno o más aminoácidos en una posición dada se sustituyen por cualquier otro aminoácido proteinogénico seleccionado del grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val. En una realización preferida, la sustitución no modifica la longitud de secuencia, es decir un residuo de un solo aminoácido se sustituye por otro residuo de un solo aminoácido. Sin embargo, también es posible eliminar uno o más residuos de aminoácido sin sustitución y/o insertar uno o más residuos aminoácidos.

En principio una sustitución en cualquier posición de una enzima puede ser una sustitución conservadora, en la que este aminoácido se sustituye por un aminoácido de características comparables (por ejemplo sustitución de un aminoácido hidrófobo por otro aminoácido hidrófobo). Además, una sustitución en cualquier posición de una enzima puede ser una sustitución no conservadora, donde este aminoácido se sustituye por un aminoácido de otras características (por ejemplo sustitución de un aminoácido hidrófobo por un aminoácido hidrófilo),

La técnica de ingeniería enzimática puede estudiarse en: S. Lutz, U.T. Bomscheuer, Protein Engineering Handbook, Wiley VCH, Weinheim 2009.

5 Cualquier sustitución de acuerdo con esta invención excluye sustituciones de aminoácidos en posiciones de la cetorreductasa de acuerdo con esta invención que son indispensables para la actividad catalítica de la cetorreductasa, de preferencia las posiciones N120, S148, Y161 y K165 de la SEQ ID NO: 2. Por otro lado, se sabe en la técnica actual que las posiciones de secuencia que participan en elementos previsible de estructuras proteínicas, por ejemplo alfa-hélices u hojas beta o interacciones iónicas, son sensibles a la mutagénesis y pueden no requerir una sustitución o solamente una sustitución simultánea con una contraposición.

10 La invención también se refiere a cetorreductasas diseñadas por ingeniería que difieren de la secuencia de aminoácidos del tipo silvestre de cetorreductasa de SEQ ID NO: 2 en 1 a 70 cambios de residuos, preferiblemente en 1 a 50 cambios de residuos, con mayor preferencia en 1 a 30 cambios de residuos, incluso todavía con más preferencia en 1 a 20 cambios de residuos y con la máxima preferencia en 1 a 11 cambios de residuos, preferiblemente incluyendo cambios en una o más de las siguientes posiciones de la SEQ ID NO: 2: Y21, V23, S33, L39, R40, A43, P68, V89, G95, P97, T98, D103, G109, V119, L121, V124, Y125, I149, L150, S154, E155, T157, A158, T163, H190, Y193, L198, L199, A201, A206, Y207, V299 y V247.

15 Preferentemente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería de acuerdo con la invención difiere de la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de cetorreductasa de la SEQ ID NO:2 en 1 a 70, preferiblemente en 1 a 50, todavía con más preferencia en 1 a 30, incluso con mayor preferencia en 1 a 20 y con máxima preferencia en 1 a 11 cambios de residuos, incluyendo preferentemente uno o más de los siguientes cambios de residuos:

20	Y21Q; V23T; S33A; L39V; R40C;	I149A, G, L, M, Q, T o V; L150A, F, H o S; S154G; E155A, D, F, G, K, L o S; T157Y;
25	A43E o G; P68S; V89F; G95A, E, M, Q, S o V; P97A, E, K, N, V o Y;	A158G, L, P, Q, S, V o W; T163A o S; H190C; Y193A, F, G, P, T ó V; L198M;
30	T98A o G; D103E; G109Y; V119Y; L121Q; V124I; Y125F;	L199A, F, I o T; A201G; A206G; Y207R o L; V229I; y/o V247I.

40 De preferencia, la cetorreductasa diseñada por ingeniería de acuerdo con la invención es capaz de reducir cualquier sustrato aldehído o es capaz de reducir estereoselectivamente cualquier sustrato ceto, preferentemente el sustrato ceto de fórmula general (i); o los derivados de 3-aril-3-cetopropanoamina de acuerdo con la fórmula general (II); o los derivados de 5-hidroxi-3-oxohexanoato de acuerdo con la fórmula general (III); o los derivados de acetofenona de acuerdo con la fórmula general (IV); o los derivados benzoilo de acuerdo con la fórmula general (V); o los derivados de secodiona de acuerdo con la fórmula general (VI); o 3-quinuclidona; o 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo; o 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo; o cetosa, o el sustrato aldehído de acuerdo con la fórmula general (I'); o 2-butanal; o 1-heptanal; y preferiblemente presenta una mejor actividad específica, una mejor estabilidad térmica y/o estereoselectividad si se compara con el tipo silvestre de cetorreductasa de SEQ ID NO:2.

50 Preferentemente, las cetorreductasas diseñadas por ingeniería de acuerdo con la invención son capaces de reducir cualquier sustrato aldehído o ceto, de preferencia sustratos ceto de fórmula general (1); o derivados de 3-aril-3-cetopropanoamina de acuerdo con la fórmula general (II); o derivados de 5-hidroxi-3-oxohexanoato de acuerdo con la fórmula general (III); o derivados de acetofenona de acuerdo con la fórmula general (IV); o derivados de benzoilo de acuerdo con la fórmula general (V); o derivados de secodiona de acuerdo con la fórmula general (VI); o 3-quinuclidona; o 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo; 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo; o cetona; o el sustrato aldehído de acuerdo con la fórmula general (I'); o 2-butanol; o 1-heptanal; y difiere de la secuencia de aminoácidos del tipo silvestre de cetorreductasa de SEQ ID NO:2 en 1-70 cambios de residuos aminoácidos, preferiblemente 1 a 50 aminoácidos, con mayor preferencia 1 a 30 aminoácidos, incluso todavía

con más preferencia por 1 a 20 aminoácidos y con máxima preferencia 1 a 11, incluyendo preferiblemente cambios en uno o más de las siguientes posiciones: Y21, V23, S33, L39, R40, A43, P68, V89, G95, P97, T96, D103, V119, L121, V124, Y125, I149, L150, S154, E155, T157, A158, T163, H190, Y193, L198, L199, A201, A206, Y207, V229 y V247.

- 5 Preferentemente, las cetereductasas diseñadas por ingeniería de acuerdo con la invención son capaces de reducir cualquier sustrato aldehído o capaces de reducir estereoselectivamente cualquier sustrato ceto, preferiblemente el sustrato ceto de fórmula general (I); o derivados de 3-aril-3-cetopropanoamina de acuerdo con la fórmula general (II); o derivados de 5-hidroxi-3-oxohexanoato de acuerdo con la fórmula general (III); o derivados de acetofenona de acuerdo con la fórmula general (IV), o derivados de benzoilo de acuerdo con la
- 10 fórmula general (V); o derivados de secodiona de acuerdo con la fórmula general (VI); o 3-quinuclidona; o 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo; 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo; o cetosa; o el sustrato aldehído de acuerdo con la fórmula general (I'); o 2-butanal; o 1-heptanal; y difieren de la secuencia de aminoácidos de la cetereductasa del tipo silvestre de SEQ ID NO:2 en 1 a 70, preferiblemente 1 a 50, con más preferencia 1 a 30, incluso con más preferencia 1 a 20 y con mayor preferencia 1 a 11 cambios de residuos, incluyendo,
- 15 preferentemente, uno o más de los siguientes cambios de residuos: Y21Q, V23T; S33A; L39V; R40C; A43E o G; P68S; V89F; G95A; E, M, Q, S o V; P97A, E, K, N, V o Y; T98A o G; D103E; G109Y; V119Y; L121Q; V124I; Y125F; I149A, G, L, M, Q, T o V; L150A, F, H o S; S154G; E155A, D, F, G, K, L o S; T157Y; A158G, L, P, Q, S, V o W; T163A o S; H190C; Y193A, F, G, P, T o V; L198M; L199A, F, I, o T; A201G; A206G; Y207R o L; V229I; y V247I.
- 20 Preferentemente, las cetereductasas diseñadas por ingeniería de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoespecíficamente uno de los siguientes sustratos N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina, N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina, (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, 1-(4-clorofenil)etanona, 1-(2-metoxifenil)etanona, fenil-(2-piridil)-metanona, etilsecodiona, 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo, 3-
- 25 quinuclidona, 3-cloro-3-oxobutanoato de etilo; o el sustrato aldehído de acuerdo con la fórmula general (I'); o 2-butanal; o 1-heptanal; y difieren de la secuencia de aminoácidos de la cetereductasa de tipo silvestre de SEQ ID NO:2 en 1 a 70 cambios de residuos aminoácidos, preferentemente 1 a 50 cambios de residuos aminoácidos; con más preferencia 1 a 30 cambios de residuos aminoácidos, incluso todavía con más preferencia 1 a 20 cambios de residuos aminoácidos y con mayor preferencia 1 a 11 cambios de residuos,
- 30 incluyendo preferentemente cambios en una o varias de las siguientes posiciones: Y21, V23, S33, L39, R40, A43, P68, V89, G95, P97, T98, D103, G109, V119, L121, V124, Y125, I149, L150, S154, E155, T157, A158, T163, H190, Y193, L198, L199, A201, A206, Y207, V229 y V247.
- Preferentemente, las cetereductasas diseñadas por ingeniería de acuerdo con la invención son capaces de reducir estereoespecíficamente uno de los siguientes sustratos: N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-
- 35 cetopropanoamina, N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina, (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, 1-(4-clorofenil)etanona, 1-(2-metoxifenil)etanona, fenil-(2-piridil)-metanona, etilsecodiona, 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo, 3-quinuclidona, 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo; o cetosa; o el sustrato aldehído de acuerdo con la fórmula general (I'); o 2-butanal; o 1-heptanal; y difieren de la secuencia de aminoácidos de la cetereductasa de tipo
- 40 silvestre de SEQ ID NO:2, en 1 a 70, preferiblemente 1 a 50; con más preferencia en 1 a 30, incluso con más preferencia 1 a 20 y de con mayor preferencia 1 a 11 cambios de residuos, incluyendo uno o más de los siguientes cambios de residuos: Y21Q; V23T; S33A; L39V; R40C; A43E o G; P68S; V89F; G95A, E, M, Q, S o V; P97A, E, K, N, V o Y; T98A o G; D103E; G109Y; V119Y; L121Q; V124I; Y125F; I149A, G, L, M, Q, T o V; L150A, F, H o S; S154G; E155A, D, F, G, K, L o S; T157Y; A158G, L, P, Q, S, V o W; T163A o S; H190C; Y193A, F, G, P, T o V; L198M; L199A, F, I o T; A201G; A206G; Y207R o L; V229I y V247I.
- 45

Preferentemente, la cetereductasa diseñada por ingeniería de acuerdo con la invención que difiere de la cetereductasa del tipo silvestre de SEQ ID NO:2 comprende una secuencia de aminoácidos o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que tiene uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO:2:

50

ES 2 686 695 T3

No.	Intercambio de aminoácidos frente a SEQ ID NO:2	SEQ ID del mutante
1.	V89F	SEQ ID NO:4
2.	Y125F	SEQ ID NO:5
3.	V229I	SEQ ID NO:6
4.	G95Q, L150F, E155S, A158L, L199T	SEQ ID NO:7
5.	G95S, L150A, E155S, Y193V, L199A	SEQ ID NO:8
6.	G95E, L150H, A158L	SEQ ID NO:9
7.	G95Q, P97A, A158Q, L199T	SEQ ID NO:10
8.	G95M, P97V, L150F, E155S, A158V, Y193P, L199T	SEQ ID NO:11
9.	G95S, P97Y, L150F, E155S, A158Q, L199I	SEQ ID NO:12
10.	G95Q, P97K, L150F, E155S, A158L, Y193A, L199T	SEQ ID NO:13
11.	G95M, P97K, L150F, E155L, A158S, Y193A, L199A	SEQ ID NO:14
12.	G95M, P97Y, L150A, E155A, A158G, Y193A	SEQ ID NO:15
13.	R40C, G95M, P97A, A158Q, L199I	SEQ ID NO:16
14.	G95M, P97N, L150A, A158L, Y193A	SEQ ID NO:17
15.	G95S, L150F, E155F, A158Q, Y193F, L199T	SEQ ID NO:18
16.	G95M, P97V, L150A, E155L, A158Q, Y193F, L199A	SEQ ID NO:19
17.	G95Q, P97A, L150F, E155S, A158V, Y193V, L199I	SEQ ID NO:20
18.	P68S, G95M, P97Y, E155F, A158L, Y193A	SEQ ID NO:21
19.	G95M, E155K, A158L, Y193T	SEQ ID NO:22
20.	G95M, E155S, A158V, Y193F, L199T	SEQ ID NO:23
21.	G95A, P97N, L150A, E155L, A158L, Y193P	SEQ ID NO:24
22.	G95Q, P97V, L150S, E155G, A158P, Y193V, L199T	SEQ ID NO:25
23.	G95M, L150A, E155F, A158S, Y193A, L199T	SEQ ID NO:26
24.	G95S, P97E, L150A, E155L, A158L, Y193V, L199T	SEQ ID NO:27
25.	G95S, A158L, Y193V, L199A	SEQ ID NO:28
26.	L150F, A158Q, Y193P	SEQ ID NO:29
27.	G95S, P97A, L150A, E155L, A158Q, Y193F, L199A	SEQ ID NO:30
28.	G95S, A158L, Y193T	SEQ ID NO:31
29.	L150F, E155K, A158S, Y193P, L199F	SEQ ID NO:32
30.	G95E, L150A, E155S, A158L, Y193V, L199T	SEQ ID NO:33

31.	G95M, L150A, A158L, Y193V	SEQ ID NO:34
32.	G95A, P97A, L150F, E155A, Y193P	SEQ ID NO:35
33.	G95A, Y193A	SEQ ID NO:36
34.	G95A, P97V, A158S, Y193A, L199I	SEQ ID NO:37
35.	G95V, A158Q, Y193A	SEQ ID NO:38
36.	L150F, E155S, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:39
37.	E155D, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:40
38.	I149L, L150F, E155S, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:41
39.	I149M, L150F, E155S, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:42
40.	I149G, L150F, E155S, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:43
41.	I149T, L150F, E155S, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:44
42.	I149Q, L150F, E155S, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:45
43.	I149A, L150F, E155S, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:46
44.	I149V, L150F, E155S, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:47
45.	D103E, L150F, E155S, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:48
46.	L150F, E155S, A158Q, Y193G, L198M	SEQ ID NO:49
47.	L150F, E155S, A158Q, Y193G, A201G	SEQ ID NO:50
48.	L150F, E155S, A158Q, Y193G, Y207R	SEQ ID NO:51
49.	L150F, E155S, T157Y, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:52
50.	L39V, L150F, E155S, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:53
51.	L150F, S154G, E155S, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:54
52.	L39V, A43G, I149V, L150F, S154G, E155S, A158Q, Y193G, A201G, Y207L	SEQ ID NO:55
53.	L39V, I149V, L150F, S154G, E155S, T157Y, A158Q, Y193G, L198M, A201G, Y207R	SEQ ID NO:56
54.	L39V, I149V, L150F, S154G, E155S, A158Q, Y193G, A201G, Y207L	SEQ ID NO:57
55.	L39V, I149V, L150F, S154G, E155S, A158Q, Y193G, L198M, A201G, Y207R	SEQ ID NO:58
56.	L39V, I149V, L150F, S154G, E155S, A158W, Y193G, L198M, A201G, Y207R	SEQ ID NO:59
57.	Y193G	SEQ ID NO:60
58.	I149V, Y193G	SEQ ID NO:61
59.	T98G, I149V, A158Q, Y193G, L198M	SEQ ID NO:62
60.	I149A	SEQ ID NO:63
61.	I149V, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:64
62.	I149V, T163A, Y193G	SEQ ID NO:65
63.	I149V, T163S, Y193G	SEQ ID NO:66
64.	I149V, A158Q, T163A, Y193G	SEQ ID NO:67
65.	I149V, A158Q, T163S, Y193G	SEQ ID NO:68
66.	I149V, H190C, Y193G	SEQ ID NO:69
67.	T98G, I149V, Y193G	SEQ ID NO:70
68.	A43G, I149V, Y193G	SEQ ID NO:71
69.	I149V, Y193G, L198M	SEQ ID NO:72
70.	I149V, L150S, E155L, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:73
71.	I149V, L150S, E155D, A158S, Y193G	SEQ ID NO:74
72.	I149V, E155L, A158Q, Y193G	SEQ ID NO:75
73.	I149V, A158S, Y193G	SEQ ID NO:76
74.	I149V, E155A, A158S, Y193G	SEQ ID NO:77
75.	I149V, E155D, A158S, Y193G	SEQ ID NO:78
76.	V23T, T98G, V119Y, V124I, I149V, A158Q, Y193G, L198M	SEQ ID NO:79
77.	T98G, G109Y, L121Q, V124I, I149V, A158Q, Y193G, L198M, A206G	SEQ ID NO:80
78.	T98G, G109Y, V124I, I149V, A158Q, Y193G, L198M, A206G, V247I	SEQ ID NO:81
79.	V23T, S33A, T98G, G109Y, V124I, I149V, A158Q, Y193G, L198M, A206G, V247I	SEQ ID NO:82
80.	V23T, S33A, T98G, V124I, I149V, A158Q, Y193G, L198M, A206G, V247I	SEQ ID NO:83

81.	G95M, L150A, A158L, Y193T, L199I	SEQ ID NO:84
82.	1149V, L150F, S154G, E155S, A158Q, Y193G, L198M, A201G, Y207R	SEQ ID NO:85
83.	L39V, 1149V, S154G, E155S, A158Q, Y193G, L198M, A201G, Y207R	SEQ ID NO:86
84.	L39V, 1149V, L150F, S154G, A158Q, Y193G, L198M, A201G, Y207R	SEQ ID NO:87
85.	L39V, 1149V, L150F, S154G, E155S, A158Q, Y193G, A201G, Y207R	SEQ ID NO:88
86.	L39V, 1149V, L150F, S154G, E155S, A158Q, Y193G, L198M, Y207R	SEQ ID NO:89
87.	G95A, I149T, Y193G	SEQ ID NO:90
88.	A43E, T98A, I149V, A158Q, Y193G, L198M	SEQ ID NO:91
89.	V23T, T98G, G109Y, V124I, I149V, A158Q, Y193G, L198M	SEQ ID NO:92
90.	Y21Q, T98G, G109Y, V124I, I149V, A158Q, Y193G, L198M, A206G	SEQ ID NO:93

Preferentemente, las cetorreductasas diseñadas por ingeniería de acuerdo con la invención son capaces de reducir cualquier sustrato aldehído o son capaces de reducir estereoselectivamente cualquier sustrato ceto, preferiblemente el sustrato ceto de fórmula general (I); o derivados de 3-aril-3-cetopropanoamina de acuerdo con la fórmula general (II); o derivados de 5-hidroxi-3-oxohexanoato de acuerdo con la fórmula (III); o derivados de acetofenona de acuerdo con la fórmula general (IV), o derivados de benzoilo de acuerdo con la fórmula general (V); o derivados de secodiona de acuerdo con la fórmula general (VI); o 3-quinuclidona; 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo; o 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo; o cetosa; o el sustrato aldehído de acuerdo con la fórmula general (I'); o 2-butanal; o 1-heptanal; y comprenden o consisten esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 o 93.

Preferentemente, las cetorreductasas diseñadas por ingeniería de acuerdo con la invención son capaces de reducir cualquier sustrato aldehído o son capaces de reducir estereoselectivamente cualquier sustrato ceto, preferiblemente el sustrato ceto de fórmula general (I); o derivados de 3-aril-3-cetopropanoamina de acuerdo con la fórmula general (II); o derivados de 5-hidroxi-3-oxohexanoato de acuerdo con la fórmula general (III); o derivados de acetofenona de acuerdo con la fórmula general (IV); o derivados de benzoilo de acuerdo con la fórmula general (V); o derivados de secodiona de acuerdo con la fórmula general (VI); o 3-quinuclidona; o 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo; o 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo; o cetosa; o el sustrato aldehído de acuerdo con la fórmula general (I'); o 2-butanal; y muestran una mejor actividad específica, estabilidad térmica y/o estereoselectividad si se comparan con la cetorreductasa de tipo silvestre de SEQ ID NO:2, y comprenden o consisten esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 o 93.

Preferentemente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería de acuerdo con la invención es capaz de reducir estereoselectivamente N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina preferentemente a (1S)-3-(dimetilamino)-1-(2-tienil)propan-1-ol y comprende o consiste esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 62, 72, 85, 86, 87, 88 u 89; en especial SEQ ID NO: 55, 58 u 87; con mayor preferencia SEQ ID NO: 58.

Preferentemente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería según la invención es capaz de reducir estereoselectivamente el sustrato N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina preferentemente a (1S)-3-(metilamino)-1-(2-tienil)propan-1-ol y comprende o consiste esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 19, 28, 40, 46, 47, 49, 50, 55, 56, 57, 58, 59, 62, 64, 67, 72, 81, 82, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 92 o 93; en especial SEQ ID NO: 58, 87 o 92; con mayor preferencia SEQ ID NO: 87.

Preferentemente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería de acuerdo con la invención es capaz de reducir estereoselectivamente (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo preferiblemente a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxi-hexanoato de terc-butilo y comprende o consiste esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 34, 36, 40, 49, 55, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 84, 91, 92 o 93, preferiblemente SEQ ID NO: 62, 91 o 92; con mayor preferencia SEQ ID NO: 91.

Preferentemente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería según la invención es capaz de reducir estereoselectivamente (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo preferentemente a (3R,5S)-6-

cloro-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo y comprende o consiste esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 34, 36, 40, 53, 54, 55, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 92 o 93; preferiblemente SEQ ID NO: 62, 91 o 92; con mayor preferencia SEQ ID NO: 91.

5 Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención diseñada por ingeniería es capaz de reducir estereoselectivamente 1-(4-clorofenil)etanona a 1-(4-clorofenil)etanol y comprende o consiste esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 7, 9, 12, 15, 17, 18, 23, 24, 28, 31, 36, 38, 39, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 62, 72, 81, 82, 83, 87 o 92; preferiblemente SEQ ID NO: 7, 15 o 28, con mayor preferencia SEQ ID NO: 28.

10 Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención diseñada por ingeniería es capaz de reducir estereoselectivamente 1-(2-metoxifenil)etanona a 1-(2-metoxifenil)etanol y comprende o consiste esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 15, 17, 22, 24, 26, 36, 38, 40, 58, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 86, 92 o 93; preferiblemente SEQ ID NO: 17, 72 o 92; con mayor preferencia SEQ ID NO: 72.

15 Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención diseñada por ingeniería es capaz de reducir estereoselectivamente fenil-(2-piridil)-metanona a fenil-(2-piridil)-metanol y comprende o consiste esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 21, 24, 28, 36, 38, 39, 40, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 92 o 93; preferiblemente SEQ ID NO: 72, 82 o 92; con mayor preferencia SEQ ID NO: 72.

20 Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención diseñada por ingeniería es capaz de reducir estereoselectivamente etilsecodiana (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14,17-diona) preferiblemente a etilseconol (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14-ona-17-β-ol) y comprende o consiste esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 61, 62, 65, 66, 69, 70, 71, 75, 78, 82, 83, 86, 92 o 93; preferiblemente SEQ ID NO: 69, 70 o 71; con mayor preferencia SEQ ID NO: 70.

30 Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención diseñada por ingeniería es capaz de reducir estereoselectivamente 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo a hidroxí-3-fenilpropanoato de etilo y comprende o consiste esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 17, 34, 36, 40, 46, 47, 52, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 84, 92 o 93; preferiblemente SEQ ID NO: 46, 76 o 78; con mayor preferencia SEQ ID NO: 76.

35 Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención diseñada por ingeniería es capaz de reducir estereoselectivamente el sustrato ceto 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo preferiblemente a (3S)-4-cloro-3-hidroxibutanoato de etilo y comprende o consiste esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 63 ó 90.

40 Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención diseñada por ingeniería es capaz de reducir estereoselectivamente 3-quinuclidona (sinónimo de clorhidrato de 1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona) a 3-quinuclidinol (sinónimo de 1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ol) y comprende o consiste esencialmente en una de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 17, 21, 26, 38, 40, 62, 72, 73, 81, 83, 86, 92 o 93; preferiblemente SEQ ID NO: 17, 21 o 73; con mayor preferencia SEQ ID NO: 17.

45 Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención diseñada por ingeniería tiene, además de una mayor actividad específica, estabilidad térmica y/o estereoselectividad si se compara con la cetorreductasa del tipo silvestre de SEQ ID NO:2, una gran actividad de cosustrato y/o estabilidad de cosustrato, en particular una alta estabilidad y/o actividad con isopropanol, 2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol o 2 heptanol.

50 Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención diseñada por ingeniería muestra una mejor actividad específica que es mayor que la actividad específica de la cetorreductasa no diseñada. La actividad específica es, preferiblemente, como mínimo del 10%, como mínimo del 50%, como mínimo del 100%, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 200 veces, al menos 300 veces, al menos 500 veces, al menos 700 veces, al menos 1.000 veces, al menos 10.000 veces o al menos 100.000 veces mayor que la actividad específica de la cetorreductasa no diseñada por ingeniería. La mejor actividad específica puede significar también que la cetorreductasa diseñada por ingeniería muestra una cierta actividad hacia el sustrato deseado, mientras que la cetorreductasa no diseñada por ingeniería no tiene ninguna actividad significativa hacia dicho sustrato.

Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención diseñada por ingeniería muestra una estabilidad térmica que es mayor que la estabilidad térmica de la cetorreductasa del tipo silvestre de SEQ ID NO: 2. Preferentemente, la cetorreductasa según la invención diseñada por ingeniería muestra una mejor estabilidad térmica con un incremento de 1°C a 40°C, preferiblemente 1°C a 30°C, con más preferencia en 1°C a 20°C, incluso con más preferencia en 3°C a 15°C y con mayor preferencia de 15°C si se compara con la cetorreductasa del tipo silvestre de SEQ ID NO: 2.

Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención diseñada por ingeniería proporciona un mejor exceso enantiomérico, que preferentemente aumenta relativamente en como mínimo 0,1%ee, como mínimo un 0,5%ee, como mínimo un 1%ee, como mínimo un 2%ee, como mínimo un 3%ee, como mínimo un 5%ee, como mínimo un 7%ee, como mínimo un 10%ee, como mínimo un 20%ee, como mínimo un 30%ee, como mínimo un 40%ee, como mínimo un 50%ee, como mínimo un 60%ee, como mínimo un 70%ee, como mínimo un 80%ee, como mínimo un 90%ee, como mínimo un 95%ee, como mínimo un 97%ee, como mínimo un 98%ee, o como mínimo un 99%ee comparado con la cetorreductasa no diseñada por ingeniería. La mejor estereoselectividad también puede significar que la cetorreductasa diseñada por ingeniería tiene una cierta estereoselectividad hacia el producto quiral deseado, mientras que la cetorreductasa no diseñada no tiene ninguna estereoselectividad significativa hacia dicho producto quiral.

La mejor actividad específica de la cetorreductasa diseñada por ingeniería comparada con la de la cetorreductasa no diseñada de SEQ ID NO: 2 se determina preferiblemente bajo condiciones estándar de reacción, típicamente a 30°C en una solución tampón acuosa que contiene el sustrato, el cofactor, opcionalmente suplementos y la cetorreductasa. Preferentemente, la solución tampón se selecciona del grupo consistente en 10-200 mM Tris/HCl pH 7-9 que contiene 2 mM de MgCl₂, 10-200 mM de fosfato sódico/NaOH pH 6-8 o 10-200 mM trietanolamina/HCl pH 7-9. El cofactor NADH se añade preferiblemente a una concentración final de entre 0,05 y 10 mM. El sustrato, que de preferencia se añade a una concentración final de 5 mM a 1 M, se selecciona preferiblemente del grupo compuesto por 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo, 1-(4-clorofenil)etanol, 1-(2-metoxifenil)etanol, (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina, etilsecodiona (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14,17-diona), (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxo-hexanoato de terc-butilo y N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina, fenil-(2-piridil)-metanona, 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo, 3-quinuclidona, 2-butanal y 1-heptanal. Opcionalmente se seleccionan otros suplementos del grupo consistente en 1-5% TritonTM X-100 (v/v) y 0,5 a 10% DMSO (v/v). Preferentemente, la cetorreductasa se añade como sobrenadante del extracto bruto. Este extracto bruto se obtiene por ruptura del huésped de expresión que contiene la cetorreductasa y subsiguiente centrifugado para separar los desechos celulares y el sobrenadante del extracto bruto que contiene la cetorreductasa. La actividad específica se determina preferiblemente midiendo la formación del producto, el agotamiento del cofactor NADH reducido y/o el agotamiento del sustrato. En caso de determinarse la actividad específica midiendo la formación del producto o el agotamiento del sustrato, se puede aplicar un sistema de regeneración de cofactor (isopropanol o GDH/glucosa) en la reacción estándar. No se aplica un sistema de regeneración del cofactor en caso de determinarse un sistema de regeneración del cofactor midiendo el agotamiento del cofactor NADH reducido. En caso de aplicarse un sistema de regeneración del cofactor, se puede sustituir el cofactor NADH reducido por el cofactor NAD⁺ oxidado, que se reduce por el sistema de regeneración del cofactor.

La estereoselectividad mejorada de la cetorreductasa diseñada por ingeniería comparada con la cetorreductasa no diseñada de SEQ ID NO: 2 se determina preferentemente bajo condiciones de reacción estándar, según se describe arriba para la determinación de la mejor actividad específica. Se aplica una analítica quiral para analizar el producto formado en la reacción.

La estabilidad térmica mejorada de la cetorreductasa diseñada por ingeniería comparada con la cetorreductasa no diseñada de SEQ ID NO: 2 se determina preferentemente incubando el extracto bruto que contiene la cetorreductasa durante 15 minutos a cierta temperatura (preferiblemente la temperatura a la que la cetorreductasa no diseñada de SEQ ID NO:2 muestra una actividad residual del 10%) en un ciclador PCR. A continuación, se incuba el extracto bruto sobre hielo durante 30 minutos. Se separan las proteínas no solubles por centrifugado y se analiza el sobrenadante en cuanto a su actividad residual de cetorreductasa en un ensayo estándar de cetorreductasa. En este ensayo estándar se oxida un sustrato adecuado para la cetorreductasa, por ejemplo isopropanol, por ejemplo a acetona, mediante la cetorreductasa, con una reducción simultánea de NAD⁺ a NADH (ya que no está presente ninguna otra cetorreductasa en este ensayo estándar, el isopropanol funciona como sustrato para la cetorreductasa y no se aplica para la regeneración del cofactor). El aumento de NADH se controla midiendo la absorción a 340 nm en un fotómetro estándar. El ensayo se realiza bajo condiciones de reacción estándar, es decir típicamente a 30°C en una solución tampón acuosa que contiene el sustrato (por ejemplo isopropanol), el cofactor y la cetorreductasa. Preferentemente la cetorreductasa se añade como sobrenadante del extracto bruto. El extracto bruto se obtiene rompiendo el huésped de expresión que contiene la cetorreductasa y centrifugado subsiguiente para separar los desechos celulares y el sobrenadante del extracto bruto que contiene la cetorreductasa. La

- solución tampón se selecciona preferentemente del grupo consistente en 10-200 mM Tris/HCl pH 7-9 que contiene 2 mM de MgCl₂, 10-200 mM fosfato sódico/NaOH pH 6-8 o 10-200 mM trietanolamina/HCl pH 7-9. El cofactor NAD⁺ preferentemente se añade a una concentración final de 0,05 a 10 mM. La cetorreductasa se añade preferentemente como sobrenadante de un extracto bruto. El extracto bruto se obtiene rompiendo el hésped de expresión que contiene la cetorreductasa y subsiguiente centrifugado para separar los desechos de células y el sobrenadante del extracto bruto con contenido en cetorreductasa.
- En una realización preferente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería que muestra una mejor estabilidad térmica difiere de la secuencia de aminoácidos de la cetorreductasa del tipo silvestre de SEQ ID NO: 2 en un cambio de residuos de al menos una de las siguientes posiciones: V89, Y125 o V229.
- En otra realización preferente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería que muestra una estabilidad térmica mejorada difiere de la secuencia de aminoácidos de la cetorreductasa del tipo silvestre de SEQ ID NO: 2 en una sustitución de aminoácidos en una, dos o tres posiciones seleccionadas entre las posiciones V89, Y125 ó V229 y en como mínimo otra sustitución de aminoácidos adicional en una posición diferente.
- En una realización especialmente preferente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería que muestra una mejor estabilidad térmica difiere de la secuencia de aminoácidos de la cetorreductasa del tipo silvestre de SEQ ID NO: 2 en uno de los siguientes cambios de residuos: V89F, Y125F o V229I.
- En otra realización preferente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería con una mejor estabilidad térmica difiere de la secuencia de aminoácidos de la cetorreductasa del tipo silvestre de SEQ ID NO: 2 en una, dos o tres posiciones seleccionadas de las posiciones V89F, Y125F o V229I y en como mínimo otra sustitución de aminoácidos en una posición diferente.
- En una realización especialmente preferente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería con una mejor estabilidad térmica difiere de la secuencia de aminoácidos de la cetorreductasa del tipo silvestre de SEQ ID NO: 2 en el cambio de residuo V89F.
- En otra realización especialmente preferente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería con una mejor estabilidad térmica difiere de la secuencia de aminoácidos de la cetorreductasa de tipo silvestre de SEQ ID NO: 2 en el cambio de residuo V89V y en como mínimo otra sustitución de aminoácidos en una posición diferente.
- En otra realización preferente, la cetorreductasa diseñada por ingeniería de acuerdo con la invención, que difiere de la secuencia de aminoácidos de la cetorreductasa del tipo silvestre de SEQ ID NO:2 en una, dos o tres posiciones seleccionadas de entre las posiciones V89, Y125 o V229, con mayor preferencia en una, dos o tres posiciones seleccionadas de las posiciones V89F, Y125F o V229I, muestra una estabilidad térmica incrementada en 1°C a 40°C, preferiblemente 1°C a 30°C, con mayor preferencia 1°C a 20°C, incluso con más preferencia 3°C a 15°C y con total preferencia 15°C si se compara con la cetorreductasa de tipo silvestre de SEQ ID NO: 2.
- En otra realización, la cetorreductasa diseñada por ingeniería de acuerdo con la invención, que difiere de la secuencia de aminoácidos de la cetorreductasa de tipo silvestre de SEQ ID NO: 2 en una, dos o tres posiciones seleccionadas de las posiciones V89, Y125 o V229 y en como mínimo además otra sustitución de aminoácidos en una posición diferente, con mayor preferencia una, dos o tres posiciones seleccionadas de las posiciones V89F, Y125F o V229I y como mínimo otra sustitución de aminoácidos en una posición diferente, muestra una estabilidad térmica incrementada en 1°C a 40°C, preferiblemente 1°C a 30°C, con más preferencia 1°C a 20°C, incluso con más preferencia 3°C a 15°C y con total preferencia 15°C en comparación con la cetorreductasa de tipo silvestre de SEQ ID NO: 2.
- Preferentemente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos con como mínimo un 85% de homología, preferiblemente como mínimo del 86% o como mínimo del 87%, con mayor preferencia como mínimo un 88% o al menos del 89%, todavía con más preferencia como mínimo del 90% o al menos del 91%, todavía más preferiblemente como mínimo del 92% o como mínimo del 93%, incluso más preferiblemente como mínimo del 94% o como mínimo del 95%, con especial preferencia como mínimo del 96% o como mínimo del 97% y en particular como mínimo del 98% o como mínimo del 99% con las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 o 93.
- En una realización preferente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención es una variante del polipéptido de SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29,

30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 o 93 comprendiendo una sustitución, eliminación y/o inserción de 1 a 36 aminoácidos, por ejemplo 1 a 6 aminoácidos, 7 a 12 aminoácidos, 13 a 18 aminoácidos, 19 a 24 aminoácidos, 25 a 30 aminoácidos o 31 a 36 aminoácidos.

En una realización preferente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención es un fragmento de como mínimo 220 residuos aminoácidos, más preferiblemente como mínimo 225 residuos aminoácidos, todavía con mayor preferencia como mínimo 230 residuos aminoácidos, incluso con más preferencia como mínimo 235 residuos aminoácidos, todavía con más preferencia como mínimo 240 residuos aminoácidos, con especial preferencia como mínimo 245 residuos aminoácidos, con mayor preferencia como mínimo 250 residuos aminoácidos, con especial preferencia como mínimo 251 residuos aminoácidos, con particular preferencia como mínimo 252 residuos aminoácidos y en particular como mínimo 253 residuos aminoácidos del polipéptido de SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 o 93. En este sentido, "fragmento" se refiere a una subsecuencia consecutiva de la SEQ ID NO respectiva pero acortada en el extremo N y/o C.

En una realización preferente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención es una proteína de fusión de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 o 93 con cualquier otro oligo- o polipéptido de aminoácidos fusionado al extremo N y/o C.

En una realización preferente, la cetorreductasa de acuerdo con la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 o 93 y adicionalmente como mínimo 10 residuos aminoácidos, preferiblemente como mínimo 20 residuos aminoácidos, incluso con más preferencia como mínimo 30 residuos aminoácidos, y con mayor preferencia como mínimo 40 residuos aminoácidos seleccionados independientemente del grupo consistente en Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val.

En algunas realizaciones, la cetorreductasa según la invención es capaz de oxidar sustratos aldehído a ácido carboxílico, donde los sustratos aldehído se seleccionan preferentemente del grupo consistente en sustratos aldehído alifáticos, aromáticos y heteroaromáticos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la reducción estereoselectiva de un sustrato ceto a un alcohol secundario, comprendiendo el método el paso de hacer reaccionar el sustrato ceto y un cofactor adecuado en presencia de una cetorreductasa de acuerdo con la invención. Preferentemente, dicho cofactor adecuado es NADH o NADPH. Todas las realizaciones preferentes definidas más arriba con relación a la cetorreductasa de acuerdo con la invención también son aplicables al método de acuerdo con la invención, por lo que ya no se reiteran más adelante.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para reducir aldehídos a alcoholes primarios, método que comprende el paso de hacer reaccionar el aldehído y un cofactor adecuado en presencia de una cetorreductasa de acuerdo con la invención. Este cofactor adecuado es preferiblemente NADH o NADPH. Todas las realizaciones preferentes arriba definidas con relación a la cetorreductasa de acuerdo con la invención se aplican también al método de acuerdo con la invención, por lo que no se repiten en adelante.

Preferentemente, el método conlleva la conversión concomitante de un cosustrato para regenerar el cofactor mediante la correspondiente cetorreductasa de alta actividad específica, donde este cosustrato se selecciona preferentemente según su actividad específica del grupo consistente en isopropanol, 2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol y 2-heptanol, y con total preferencia convirtiéndose el isopropanol en acetona con una gran actividad específica. En una realización preferente del método de acuerdo con la invención, se regenera el cofactor NAD(P)⁺ oxidado utilizando NADPH:NADH oxidasa (NOX), por ejemplo de *Lactobacillus sanfranciscensis* (Lountos et al, Acta Cryst. (2004), D60, 2044-2047) y un cosustrato adecuado, por ejemplo isopropanol.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la oxidación estereoselectiva de alcoholes secundarios a productos ceto, comprendiendo el método el paso de hacer reaccionar el alcohol secundario y

un cofactor adecuado en presencia de una cetorreductasa de acuerdo con la invención. Dicho cofactor adecuado es preferentemente NAD^+ o NADP^+ . Todas las realizaciones preferentes arriba definidas con respecto a la cetorreductasa de acuerdo con la invención se aplican también al método de acuerdo con la invención, por lo que no se repiten en lo que sigue.

- 5 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos, método que comprende el paso de hacer reaccionar el alcohol primario y un cofactor adecuado en presencia de una cetorreductasa de acuerdo con la invención. Dicho cofactor adecuado es preferiblemente NAD^+ o NADP^+ . Todas las realizaciones preferentes arriba definidas con respecto a la cetorreductasa de acuerdo con la invención se aplican también al método de acuerdo con la invención, por lo que no se repiten en lo que sigue.

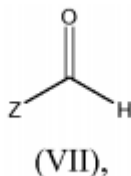
10 Preferentemente, el método implica la conversión concomitante de un cosustrato para regenerar el cofactor mediante la correspondiente cetorreductasa de alta actividad específica, donde tales cosustratos se seleccionan preferentemente según su actividad específica del grupo consistente en isopropanol, 2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol y 2-heptanol, y con mayor preferencia se convierte el isopropanol en acetona con una gran actividad específica. En una realización preferente del método de acuerdo con la invención, se regenera el cofactor NAD(P)H reducido utilizando NADPH:NADH oxidasa (NOX) de por ejemplo *Lactobacillus sanfranciscensis* (Lountos et al., Acta Cryst. (2004), D60, 2044-2047) y un cosustrato adecuado, por ejemplo acetona.

20 De preferencia, en el método de acuerdo con la invención para la reducción estereoselectiva de sustratos ceto a alcoholes secundarios y para la reducción de sustratos aldehído a alcoholes primarios, respectivamente, el sustrato aldehído y el sustrato ceto pueden ser cualquier sustrato aldehído o ceto, preferentemente el sustrato ceto de fórmula general (I) o el sustrato aldehído de fórmula general (I'); o derivados de 3-aril-3-cetopropanoamina de acuerdo con la fórmula general (II); o derivados de 5-hidrox-3-oxohexanoato de acuerdo con la fórmula general (III); o derivados de acetofenona de acuerdo con la fórmula general (IV); o derivados de benzoilo de acuerdo con la fórmula general (V); o derivados de secodiona de acuerdo con la fórmula general (VI); o 3-quinuclidona; o 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo; o 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo; o cetosa; o 2-butanal; o 1-heptanal.

Todas las realizaciones preferidas arriba definidas con respecto a los sustratos ceto y aldehído de acuerdo con la invención también son aplicables al método de acuerdo con la invención, por lo que no se repiten.

- 30 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para oxidar sustratos aldehído a ácido carboxílico, método que comprende el paso de hacer reaccionar el sustrato aldehído y un cofactor adecuado en presencia de una cetorreductasa de acuerdo con la invención. Dicho cofactor adecuado es preferiblemente NAD^+ o NADP^+ . Todas las realizaciones preferidas arriba definidas con respecto a la cetorreductasa de acuerdo con la invención también son aplicables al método de acuerdo con la invención, por lo que no se repiten.

Preferentemente, el sustrato aldehído es de la fórmula general (VII)



- 40 donde Z se selecciona entre grupos hidrocarburo alifáticos o alicíclicos (C_{1-12}) saturados o insaturados, no sustituidos o mono o polisustituidos; grupos hidrocarburo aromáticos (C_{6-10}) no sustituidos o mono o polisustituidos, opcionalmente unidos a la fracción CO a través de un grupo hidrocarburo alifático (C_{1-12}) saturado o insaturado, no sustituido o mono o polisustituido, y grupos hidrocarburo heteroaromáticos no sustituidos o mono o polisustituidos, opcionalmente unidos a la fracción CO a través de un grupo hidrocarburo alifático (C_{1-12}) saturado o insaturado, no sustituido o mono o polisustituido,

- 45 donde mono o polisustituido significa independientemente sustituido con uno o más grupos funcionales seleccionados de -halo, -OH, =O, -O-alquilo (C_{1-12}), -O-arilo (C_{6-10}), -O-heteroarilo, -OCO-alquilo (C_{1-12}), -OCO-arilo (C_{6-10}), -OCO-heteroarilo, -SH-S-alquilo (C_{1-12}), S-arilo (C_{6-10}), -S-heteroarilo, -S(=O)₁₋₂OH, -NO, -NO₂, -N₃, -NH₂, -NH(alquilo (C_{1-12})), -N(alquilo (C_{1-12}))₂, -NH(arilo (C_{6-10})), -N(arilo (C_{6-10}))₂, -NH(heteroarilo), -N(heteroarilo)₂, -CN, CHO, -CO₂H, CO-alquilo (C_{1-2}), -CO-arilo (C_{6-10}) y -CO-heteroarilo.

Preferentemente, el método implica una conversión concomitante de un cosustrato para regenerar el cofactor mediante la correspondiente cetorreductasa de alta actividad específica, donde tales cosustratos se seleccionan preferentemente según su actividad específica del grupo consistente en isopropanol, 2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol y 2-heptanol, y con mayor preferencia para convertir isopropanol en acetona con una gran actividad específica. En una realización preferente del método de acuerdo con la invención, el cofactor NAD(P)H reducido se regenera empleando NADPH:NADH oxidasa (NOX), por ejemplo de *Lactobacillus sanfranciscensis* (Lounton et al., Acta Cryst. (2004), D60, 2044-2047) y un cosustrato adecuado, por ejemplo acetona.

Así, la presente invención se refiere a un método para:

- preparar un alcohol secundario, implicando la reducción preferiblemente estereoselectiva de un cetosustrato para obtener dicho alcohol secundario;
- preparar un alcohol primario, implicando la reducción de un sustrato aldehído para obtener dicho alcohol primario;
- preparar un producto ceto, implicando la oxidación de un sustrato alcohol secundario a dicho producto ceto;
- preparar un aldehído, implicando la oxidación de un sustrato alcohol primario a dicho aldehído; y/o
- preparar un ácido carboxílico, implicando la oxidación de un sustrato aldehído a dicho ácido carboxílico;

donde el método comprende el paso de hacer reaccionar el sustrato y un cofactor adecuado en presencia de una cetorreductasa de acuerdo con la invención. Para una reacción de reducción catalizada por cetorreductasa (reducción de un sustrato ceto al correspondiente alcohol secundario, reducción de aldehído al correspondiente alcohol primario) se requiere que el cofactor adecuado esté presente en su forma reducida como donador de electrones. Para una reacción de oxidación catalizada por cetorreductasa (oxidación de un alcohol secundario a la correspondiente cetona, oxidación de un alcohol primario al correspondiente aldehído, oxidación de un aldehído al correspondiente ácido carboxílico) se requiere que el cofactor adecuado esté presente en forma oxidada como aceptor de electrones.

Cuando el sustrato es quiral, la reacción puede producirse estereoespecíficamente y, por tanto, puede utilizarse por ejemplo para una resolución racémica cinética.

Para llevar a cabo los procesos, por ejemplo reducción de cetonas, a escala preparatoria, el método de acuerdo con la invención puede realizarse considerando otras condiciones específicas de reacción, teniendo en cuenta uno o más parámetros seleccionados de entre los siguientes: la reducción a escala preparatoria puede realizarse bien con isopropanol, por ejemplo, o con glucosa/GDH para regenerar el cofactor. El método de acuerdo con la invención se puede realizar en un entorno acuoso, en un entorno no acuoso o en un sistema bifase. El método de acuerdo con la invención puede realizarse a valores de pH entre 4 y 11 y/o a temperaturas entre 5°C y 90°C y/o con una concentración del sustrato de 1 a 800 g/l. El método de acuerdo con la invención puede realizarse con una enzima libre o inmovilizada. El método de acuerdo con la invención puede realizarse como proceso por lotes o con una retirada continua del producto. El método de acuerdo con la invención puede realizarse con una alta alimentación de sustrato y/o por enlace (por ejemplo por adsorción) del producto a una fase sólida en el reactor y/o mediante la adición de disolventes miscibles en agua y/o bajo grandes fuerzas de cizalladura.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para aumentar la estabilidad térmica de una cetorreductasa con una secuencia de aminoácidos que es alineable con la SEQ ID NO: 2, método que implica el diseño por ingeniería de la cetorreductasa, preferiblemente de la cetorreductasa de SEQ ID NO: 2, en como mínimo una posición de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en las posiciones correspondientes a las posiciones V89, Y125 y/o V229 de la SEQ ID NO: 2. En este sentido, "alineable" significa que se puede hacer una comparación significativa y una alineación de ambas secuencias, de modo que se pueden identificar los residuos aminoácidos que corresponden a las posiciones V89, Y125 y/o V229 de la SEQ ID NO: 2. Típicamente, las secuencias de aminoácidos que pertenecen a la familia SDR (familia de proteínas PF00106 en la Base de Datos de Familias de Proteínas (Base de datos de las familias de proteínas Pfam: M. Punta, P.C. Coghill, R.Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Boursnell, N. Pang, K. Forslund, G. Geric, J. Clements, A. Heger, L. Holm, E.L.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, A. Bateman, R.D. Finn Nucleic Acids Research (2012) Database Issue 40:D290-D301), versión Pfam 27.0) y/o comprenden una actividad de cetorreductasa (reducción de aldehídos y cetonas para obtener los correspondientes alcoholes primarios y secundarios, respectivamente, y/o oxidación de los alcoholes primarios y secundarios para obtener los correspondientes aldehídos y cetonas, respectivamente) y/o que tienen una homología con la SEQ ID NO: 2 de como mínimo un 30%, se pueden considerar "alineables". Preferentemente, el método incluye el diseño por ingeniería de la cetorreductasa en una, dos o tres posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo consistente en las posiciones correspondientes a las posiciones V89, Y125 y/o V229 de la SEQ ID NO: 2 y además diseñando

por ingeniería esta secuencia de aminoácidos, es decir sustituyendo el respectivo residuo aminoácido por cualquier otro residuo aminoácido proteínico.

- 5 Preferentemente, el método está previsto para aumentar la estabilidad térmica de las cetorreductasas de acuerdo con cualquier SEQ ID NO: 2 o de cualquier cetorreductasa con una homología de como mínimo un 72% con la cetorreductasa de SEQ ID NO: 2, mediante el diseño de ingeniería de la cetorreductasa en al menos una posición de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en las posiciones V89, Y125 y/o V229. Preferentemente, el método implica el diseño por ingeniería de la cetorreductasa en una, dos o tres posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo consistente en las posiciones correspondientes a las posiciones V89, Y125 y/o V229, y además diseñando por ingeniería dicha secuencia de aminoácidos.
- 10 Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso para preparar un producto, preferentemente un producto quiral, que comprende:
- el método para la reducción estereoselectiva de un sustrato ceto a un alcohol secundario de acuerdo con la invención;
 - el método para reducir aldehídos a alcoholes primarios de acuerdo con la invención;

15

 - el método para la oxidación estereoselectiva de alcoholes secundarios a productos ceto de acuerdo con la invención;
 - el método para oxidar alcoholes primarios a aldehídos de acuerdo con la invención; y/o
 - el método para oxidar sustratos aldehído para obtener ácidos carboxílicos de acuerdo con la invención.

20 Todas las realizaciones preferentes arriba definidas con respecto a diferentes métodos de acuerdo con la invención, incluyendo la cetorreductasa de acuerdo con la invención, los sustratos ceto de acuerdo con la invención, los sustratos alcohol secundario de acuerdo con la invención, los sustratos aldehído de acuerdo con la invención, los sustratos alcohol primario de acuerdo con la invención son aplicables también al proceso de acuerdo con la invención, por lo que no se repiten.

25 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una cetorreductasa de acuerdo con la invención para la reducción estereoselectiva de un sustrato ceto a un alcohol secundario.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una cetorreductasa de acuerdo con la invención para la reducción de un aldehído a un alcohol primario.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una cetorreductasa de acuerdo con la invención para la oxidación de un alcohol secundario a un producto ceto.

30 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una cetorreductasa de acuerdo con la invención para la oxidación de un alcohol primario a un producto aldehído.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una cetorreductasa de acuerdo con la invención para la oxidación de un aldehído a un ácido carboxílico.

35 De preferencia, en el uso según la invención para la reducción estereoselectiva de sustratos ceto a alcoholes secundarios y para la reducción de sustratos aldehído a alcoholes primarios, respectivamente, el sustrato aldehído y el sustrato ceto pueden ser cualquier sustrato aldehído o ceto, preferentemente el sustrato ceto de fórmula general (I); o derivados de 3-aril-3-cetopropanoamina de acuerdo con la fórmula general (II); o derivados de 5-hidroxi-3-oxohexanoato de acuerdo con la fórmula general (III); o derivados de acetofenona de acuerdo con la fórmula general (IV); o derivados de benzoilo de acuerdo con la fórmula general (V); o

40 derivados de secodiona de acuerdo con la fórmula general (VI); o 3-quinuclidona; o 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo; o 2-butanal; o 1-heptanal.

Todas las realizaciones preferentes arriba definidas con relación a los sustratos ceto y aldehído de acuerdo con la invención son aplicables también al método de acuerdo con la invención, por lo que no se repiten.

Los siguientes ejemplos ilustran, además, la invención, pero no se consideran limitativos de su alcance.

45 **Ejemplo 1: Detección del gen de la nueva cetorreductasa correspondiente a SEQ ID NO:1**

El gen de la nueva cetorreductasa se detectó durante un rastreo (screening) de nuevas cetorreductasas en una librería genómica derivada de comunidades microbianas que viven en madera muerta en la punta de un tilo de hojas pequeñas (*Tilia cordata*). Se aisló el ADN de microorganismos cultivados selectivamente en un formato de 96 pocillos, se fragmentó hasta el tamaño deseado y se clonó en el sistema vector de expresión

de promotor doble pF2F4 (WO2010/075956 A1). Los plásmidos resultantes se transformaron en células de *E. coli* BL21(DE3)placI(+). El rastreo de la librería se realizó con un rastreo de subgrupo (WO2005/040376 A2), con tamaños de subgrupo de 5.000 a 350.000 clones por placa.

- 5 Para la expresión de la librería genómica, se cultivaron las células en un medio ZYM505 (F. William Studier, Protein Expression and Purification 41 (2005) 207-234), complementado con kanamicina (50 mg/l) y cloramfenicol (34 mg/l). La expresión de los genes de la librería genómica se indujo en una fase logarítmica bien por IPTG (0,1 mM) o por arabinosa (0,1 (v/v)). Los cultivos se realizaron a 30°C durante 16 horas.

- 10 Se cosecharon las células por centrifugación (3220xg, 20 min, 4°C) y se rompieron con un tampón de lisis celular (50 mM Tris-HCl pH 7,0; 2 mM MgCl₂, 1xCellLytic B (Sigma); 0,02 U de ADN nucleasa, lisozima 0,5 mg/ml). Los extractos brutos se separaron de los desechos celulares por centrifugado (3220xg, 30 min, 4°C).

Se investigaron los extractos brutos de la librería genómica en cuanto a su capacidad para reducir la mezcla de sustratos: 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo y 1-(4-clorofenil)etanona midiendo la reducción de absorbancia a 340 nm resultante de la oxidación de NAD(P)H.

Ejemplo 2: Expresión del nuevo gen de cetorreductasa correspondiente a SEQ ID NO:1

- 15 El gen de la cetorreductasa de reciente descubrimiento correspondiente a la SEQ ID NO:1 se clonó en el vector de expresión pLE1A23 (derivado de pRSF-1b, Novagen). Además, se realizó una optimización de codón del gen para la expresión en *E.coli* mientras se reducía simultáneamente el contenido en GC (véase SEQ ID NO: 2). El gen se clonó en el vector de expresión pLE1A27 (derivado de pRSF-1b, Novagen). El plásmido resultante se utilizó para la transformación de células de *E. coli* BL21 (DE3).

- 20 Para la expresión se cultivaron las células del *nuevo gen de cetorreductasa correspondiente a la SEQ ID NO: 1* en un medio de ZYM505 (F. William Studier, Protein Expression and Purification 41 (2005) 207-234) complementado con kanamicina (50 mg/l) a 37°C. La expresión del gen se indujo en una fase logarítmica por IPTG (0,1 mM) y se realizó a 30°C durante 16-18 horas.

- 25 Se cosecharon las células mediante centrifugado (3220xg, 20 min, 4°C) y se rompieron con un tampón de lisis celular (50 mM tris-HCl pH 7,0; 2 mM MgCl₂, 1xCellLytic B (Sigma); 0,02 de ADN de nucleasa, lisozima 0,5 mg/ml). Los extractos brutos se separaron de los desechos celulares por centrifugado (3220xg 30 min, 4°C).

- 30 Se investigó el extracto bruto en cuanto al nivel de expresión de cetorreductasa mediante desnaturalización de SDS-PAGE y a su capacidad para reducir 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo midiendo la reducción de la absorbancia a 340 nm resultante de la oxidación de NAD(P)H.

Ejemplo 3: Reducción a escala preparatoria de 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo a (3S)-4-cloro-3-hidroibutanoato de etilo con la nueva cetorreductasa de SEQ ID NO: 2

- 35 Se disolvieron 24,08 g de monohidrato de D(+)-glucosa a 0,1M de tampón fosfato sódico a pH 6,5 hasta obtener un volumen final de 45 ml en un matraz de 250 ml de fondo circular equipado con agitador magnético. El pH de la solución se ajustó a 6,5-6,6 con NaOH. Se añadieron 10,7 mg de la cetorreductasa nueva de SEQ ID NO: 2, 22,9 mg de glucosa deshidrogenasa (GDH-03, comercialmente disponible de c-LEcta GmbH) y 39,8 mg de NAD⁺, en cada caso disueltos en 5 ml de tampón fosfato sódico 0,1M, pH 6,5. El matraz se conectó con un dispositivo de titulación de pH Stat y se templó hasta 35°C durante la agitación. La reacción se inició por la adición controlada paso a paso de una solución de 18,18 g de 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo en 9,375 ml de acetato de n-butilo. La mezcla se agitó durante todo el tiempo de reacción y se calentó a 35°C. El pH se controló automáticamente por adición de NaOH con el dispositivo de pH Stat (punto de ajuste: pH = 6,5). El progreso de la reacción se controló mediante el seguimiento de la cantidad de NaOH 5M que se tituló automáticamente por pH Stat. Después de 22 horas se terminó la reacción y el resultado era una conversión total de $\geq 99,9\%$, analizada por analítica GC. Se vio que el producto de la reducción tenía un exceso enantiomérico de $\geq$ para el (3S)-4-cloro-3-hidroibutanoato de etilo.
- 45

Ejemplo 4: Evaluación de variantes de cetorreductasas en cuanto a su estabilidad térmica

- 50 Se analizaron varias variantes de cetorreductasas generadas en cuanto a su estabilidad térmica. Se registraron los perfiles de fusión por incubación del extracto bruto conteniendo cetorreductasa durante 15 minutos a diferentes temperaturas en un ciclador PCR. Después se incubaron los extractos brutos durante 30 minutos sobre hielo. Las proteínas no solubles se separaron por centrifugado y los sobrenadantes se analizaron en cuanto a su actividad residual de cetorreductasa en un ensayo de cetorreductasa estándar. En este ensayo estándar se oxidó isopropanol a acetona mediante la cetorreductasa, con una reducción

concomitante de NAD^+ a NADH : El aumento de cetorreductasa se controla midiendo la absorción a 340 nm en un fotómetro estándar.

Se descubrió que la cetorreductasa correspondiente a la SEQ ID NO: 4 tenía una temperatura de fusión (T_m) 15°C superior a la T_m de tipo silvestre de cetorreductasa de SEQ ID NO:2.

5 Ejemplo 5: Reducción de (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo por cetorreductasas diseñadas por ingeniería derivada a partir de la cetorreductasa de SEQ ID NO: 2

Se analizaron numerosas cetorreductasas diseñadas por ingeniería en cuanto a su capacidad para reducir el sustrato (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo a (5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo. Se realizaron ensayos de rastreo a escala de placa de 96 pocillos con un volumen final de 150 μl por pocillo en una solución tampón fosfato sódico pH 6,5 y a una concentración final de 0,1M de (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo purificado y 1 mM del cofactor NAD^+ . Las reacciones se iniciaron por adición de 10 μl de una dilución 1 a 300 del extracto bruto en 0,05 de un tampón tris-HCl pH 7, 0,2 mM de MgCl_2 a cada pocillo. Se determinaron las actividades de las variantes de la cetorreductasa midiendo la reducción de la absorbancia a 340 nm en un lector de placas a 30°C. Se descubrió que la variante de cetorreductasa correspondiente a la SEQ ID NO: 91 reducía el sustrato (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo 55 veces más que la cetorreductasa de SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 6: Reducción a escala preparatoria de (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo por cetorreductasas diseñadas por ingeniería derivadas de la cetorreductasa de SEQ ID NO: 2

Se pesaron 4,3 g de un lote bruto de (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo (pureza aprox. 70%) en un vaso de precipitados de cristal (correspondiente a 3 g de (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo puro). Se añadió una solución de 3,7 g de monohidrato de D(+)-glucosa en agua (volumen final 6,8 ml), 1,5 ml de una solución tampón 1M fosfato sódico pH 6,5 y 10 mg de NAD^+ disuelto en agua. El pH de la solución se ajustó a 6,5-6,6 con NaOH. La mezcla de la reacción se conectó con un dispositivo de titulación de pH Stat y se templó a 30°C con agitación. La reacción se inició añadiendo una solución de la cetorreductasa diseñada por ingeniería correspondiente a la SEQ ID NO: 91 (21 mg) y de glucosa hidrogenasa (GDH-03, 10 mg) en agua. La mezcla se agitó durante todo el tiempo de la reacción y se calentó a 30°C. El pH se controló automáticamente mediante la adición de NaOH por el dispositivo de pH-Stat (punto de ajuste: pH = 6,5). El progreso de la reacción se controló mediante el seguimiento de la cantidad de NaOH 5M que se tituló automáticamente por pH Stat. La reacción se terminó después de 12 horas, con el resultado de una conversión total de $\geq 95\%$ analizada por analítica HPLC (detección a 212 nm y 200 nm, cuantificación por curvas de calibrado de sustrato y producto). Se vio que el producto de la reducción tenía un exceso diastereomérico de ≥ 99 para el producto "syn" ((3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo) frente al producto anty correspondiente ((3S,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo) medido por HPLC quiral.

35 Ejemplo 7: Reducción de N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina mediante cetorreductasas diseñadas por ingeniería derivadas de ADH97.

Se analizaron numerosas cetorreductasas diseñadas por ingeniería en cuanto a su capacidad para reducir el sustrato N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina a N,N-dimetil-3-hidroxi-3-(2-tienil)-1-propanoamina. Se realizaron ensayos de rastreo a escala de placas de 96 pocillos con un volumen final de 300 μl por pocillo en una solución tampón 0,1M trietanolamina/HCl pH 9,0; 50 isopropanol (v/v) y con una concentración final 0,5M de N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina y 1 mM del cofactor NAD^+ . Las reacciones se iniciaron por adición de 10 μl de una dilución de 1 a 10 de un extracto bruto 0,1M en una solución tampón trietanolamina-HCl por pocillo. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 20 h. Se determinaron las actividades de las variantes de cetorreductasa por análisis HPLC (detección de 230 nm/245 nm; determinación de la conversión de sustrato y producto mediante curvas de calibrado de sustrato y producto). Se descubrió que la variante de cetorreductasa correspondiente a la SEQ ID NO: 58 era capaz de reducir el sustrato N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina. Después de 20 horas de reacción, se obtuvo una conversión del 23%. La cetorreductasa de SEQ ID NO: 2 no mostró conversión alguna bajo las condiciones dadas.

50 Ejemplo 8: Reducción a escala preparatoria de N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina por cetorreductasas diseñadas por ingeniería derivadas de la cetorreductasa de SEQ ID NO: 2

En un matraz de 500 ml de fondo circular equipado con agitador magnético se añadió una solución de NaOH al 25% (110 ml), isopropanol (41,5 ml) y clorhidrato de N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina (60 g). Se agitó el lodo resultante a temperatura ambiente hasta disolución completa y separación de fases. A 27,3 ml de la capa superior se añadió agua (40 ml) en un vaso de precipitados. Se ajustó el pH de la solución

a 9,0 por adición de ácido sulfúrico concentrado. Se añadieron 37,5 ml de isopropanol a la mezcla, mezclando a continuación con 66,5 mg de NAD⁺ en un matraz de 250 ml de fondo redondo. El cuello del matraz se conectó a un evaporador rotatorio y se calentó la solución a 40°C, girando el matraz en un baño de aceite precalentado (40°C). Para iniciar la reacción se añadió una solución de la cetorreductasa diseñada por ingeniería correspondiente a la SEQ ID NO: 58 (1,35 g) disuelta en 22,5 ml de agua. Durante todo el tiempo de la reacción se giró el matraz y se calentó a 40°C en un baño de aceite y se aplicó un vacío (110 mbar, 82,5 mm Hg) con el fin de eliminar principalmente acetona e isopropanol. Periódicamente, cada media hora, se añadió una mezcla precalentada (40°C) de isopropanol y agua (80:20) a la mezcla de reacción. Cada hora se tomaban muestras para controlar el progreso de la reacción y se analizaban por HPLC (detección a 230 nm/ 245 nm; determinación de la conversión mediante curvas de calibrado de sustrato y producto). La reacción se completó después de 8 horas y el resultado era una conversión general de $\geq 98\%$. Se vio que el producto de reducción tenía un exceso enantiomérico de $\geq 99,5\%$ a favor del enantiomero (1S)-3-(dimetilamino)-1-(2-tienil)propan-1-ol.

Ejemplo 9: Reducción de etilsecodiona (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14,17-diona) mediante cetorreductasas diseñadas por ingeniería derivadas de la cetorreductasa de SEQ ID NO: 2

Se analizaron numerosas cetorreductasas diseñadas por ingeniería en cuanto a su capacidad para reducir el sustrato etilsecodiona (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14,17-diona). Se realizaron ensayos de rastreo a escala de placas de 96 pocillos con un volumen final de 500 μ l por pocillo en una solución tampón 0,1M de trietanolamina/HCl pH 7,0; 2 mM de MgCl₂, 50% de isopropanol (v/v), 1% de TritonTM X-100 (v/v), 3% de DMSO (v/v) y una concentración final de 10 g/l de etilsecodiona (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14,17-diona) y 1 mM del cofactor NAD⁺. La reacción se inició por adición de 100 μ l de una dilución 1 a 10 de un extracto bruto por pocillo. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 4 h con agitación. Se determinaron las actividades de las variantes de cetorreductasa mediante análisis de HPLC (detección a 265 nm; determinación de la conversión mediante curvas de calibrado de sustrato y producto). Se descubrió que la variante de cetorreductasa que corresponde a la SEQ ID NO: 70 era capaz de reducir el sustrato etilsecodiona (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14,17-diona) con una conversión del 94% y un exceso estereomérico para el 17- β -seconol (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14-ona-17- β -ol) de $\geq 99,5\%$ bajo las condiciones dadas. La cetorreductasa de SEQ ID NO: 2 no resultó en ninguna conversión bajo las condiciones dadas.

La cetorreductasa diseñada por ingeniería correspondiente a la SEQ ID NO: 70 también se puede utilizar para la reducción a escala preparatoria de etilsecodiona (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14,17-diona) en condiciones similares a las descritas en este ejemplo, donde se aplica una alimentación del sustrato.

Ejemplo 10: Reducción de (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo mediante cetorreductasas diseñadas por ingeniería derivadas de la cetorreductasa de SEQ ID NO: 2

Se analizaron numerosas cetorreductasas generadas diseñadas por ingeniería en cuanto a su capacidad para reducir el sustrato (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo a (5S)-6-cloro-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo. Se realizaron ensayos de rastreo a escala de placas de 96 pocillos con un volumen final de 150 μ l por pocillo en una solución tampón de fosfato sódico 0,1M con un pH 6,5 y una concentración final de 25 mM de (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo y 1 mM del cofactor NAD⁺. Las reacciones se iniciaron por adición de 10 μ l de varias diluciones de extracto bruto en una solución tampón 0,05M tris-HCl pH 7,0, 2 mM de MgCl₂ a cada pocillo. Se determinaron las actividades de las variantes de cetorreductasa midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm en un lector de placas a 30°C. Se descubrió que las variantes de cetorreductasa correspondientes a las SEQ ID NO: 62 y 91 reducían el sustrato (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato tres veces más que la cetorreductasa de SEQ ID NO: 2.

Las cetorreductasas diseñadas por ingeniería correspondientes a las SEQ ID NO: 62 y 91 también se pueden utilizar para una reducción a escala preparatoria de (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo a (3R,5S)-6-cloro-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo bajo condiciones comparables a las condiciones descritas en el ejemplo 6.

Ejemplo 11: Reducción de N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina por cetorreductasas diseñadas por ingeniería derivadas de la cetorreductasa de SEQ ID NO: 2

Se analizaron numerosas cetorreductasas generadas diseñadas por ingeniería en cuanto a su capacidad para reducir el sustrato N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina a N-monometil-3-hidroxi-3-(2-tienil)-1-propanoamina. Se realizaron ensayos de rastreo a escala de placas de 96 pocillos con un volumen final de 200 μ l por pocillo en una solución tampón 0,1M de trietanolamina/HCl con un pH 7,0; 10 isopropanol

5 (v/v) y con una concentración final 0,1M de N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina y 1 mM del cofactor NAD⁺. Las reacciones se iniciaron por adición de 10 µl de extracto bruto por pocillo. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 4 h y 24 h. Se determinaron las actividades de las variantes de cetorreductasa por análisis de HPLC (detección a 230 nm/ 245 nm; determinación de la conversión mediante curvas de calibrado de sustrato y producto) del sustrato y producto. Se descubrió que las variantes de cetorreductasa correspondientes a la SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 87 eran capaces de reducir mejor el sustrato N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina. La cetorreductasa de SEQ ID NO: 2 no mostró ninguna conversión bajo las condiciones dadas.

10 Las cetorreductasas diseñadas por ingeniería correspondientes a las SEQ ID NO: 58 y 87 también pueden utilizarse para la reducción a escala preparatoria de N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina a (1S)-3-(metilamino)-1-(2-tienil)propan-1-ol bajo condiciones comparables con las condiciones descritas en el ejemplo 6 u 8.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> c-LEcta GmbH
<120> Cetorreductasas

<130> IV0014-WO

<150> EP 14165444.2
20 <151> 2014-04-22

<160> 93

<170> Versión patentada 3.5
25

<210> 1
<211> 765
<212> ADN
<213> desconocido
30

<220>
<223> aislado de librería

<400> 1

ES 2 686 695 T3

	atggctacac aattcgacgg taagaccgct ctcatcaccg gaggggcttc cggcatcggc	60
	tatgccgtcg ccctcgagct cgccgcggag ggtgccagcg tcgtcgtgca ggacctgcgc	120
	ctcgaagcag cacagcaggt ggcagatgag atcaccgccg cgggcggcac ggcgatcgcc	180
	gtagccggcg acgtcggcaa gccggaagac gtcaaagccg ccgtcgacgc cgccgtggcc	240
	gcctatggcg ccctgcacct tgccgtcaac aacgccggca tcggcgggcc caccgggctc	300
	atcggcgact acgacgactc cgatggcttc gccgcctacc gcaagctcat cgatgtgaac	360
	cttaactccg tctactacgg cctgcgctat gagatccctg ccatcatcag cgcgggcggc	420
	ggttccattg tgaacacctc gtccatcctc gggctggtat ccgagccgac cgccgccccg	480
	tacacgacgg ccaagcacgg tgttgccggc ctgaccaagg ccgctgccgc gggctacgcg	540
	tcccaggggtg tccgcatcaa ctccgtccac ccgggataca tcgacacccc cctgctcgcc	600
	gcgatgcca aagaggccta cgacgccctc gtgtccaagc acccgatcgg ccgcctgggt	660
	accgcggaag aagtcgcca cctcgtgact ttctctctca gtgataaggc cagcttcac	720
	accggctcgc aacacgtcgt tgacggcgga tacgtcgcg tctag	765
	<210> 2	
	<211> 254	
	<212> PRT	
5	<213> desconocido	
	<220>	
	<223> aislado de librería	
10	<400> 2	
	Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala	
	1 5 10 15	

ES 2 686 695 T3

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

<210> 3

5 <211> 765

<212> ADN
<213> artificial

<220>

5 <223> secuencia sintética artificial optimizada en codón

<400> 3

```

atggcaaccc agtttgatgg taaaaccgca ctgattaccg gtggtgcaag cggatttggt      60
tatgcagttg cactggaact ggcagcagaa ggtgccagcg ttgttggtca ggatctgcgt      120
ctggaagcag cacagcaggt tgcagatgaa attaccgcag ccggtggcac cgcaattgca      180
gttgccggtg atgttggtaa accggaagat gttaaagcag cagttgatgc agccgttgca      240
gcatatgggtg cactgcatct ggcagttaat aatgcaggta ttggtggtcc gaccggtctg      300
attggtgatt atgatgatag tgatggtttt gcagcctatc gcaaactgat tgatgttaat      360
ctgaacagcg tgtattatgg cctgcgttat gaaattccgg caattattag tgccggtggt      420
ggtagcattg ttaataaccag cagcattctg ggtctggtta gcgaaccgac cgcagcaccg      480
tataaccaccg caaaacatgg tgttgccagg ctgaccaaag cagccgcagc gggttatgca      540
agccaggggtg ttcgtattaa tagcgttcat ccgggttata ttgatacacc gctgctggca      600
gcaatgccga aagaagcata cgacgcactg gttagcaaac atccgattgg tcgtctgggc      660
accgcagaag aagttgcaca tctggttacc tttctgctga gcgataaagc aagctttatt      720
accggtagcc agcatgttgt tgatgggtgt tatgttgcag tttaa      765

```

10 <210> 4
<211> 254
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> aislado de librería

<400> 4

```

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1           5           10           15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20          25          30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35          40          45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50          55          60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65          70          75          80

```

ES 2 686 695 T3

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Phe Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Ala Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Tyr Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 5

5 <211> 254

<212> PRT

<213> artificial

10 <220>

<223> aislado de librería

<400> 5

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

ES 2 686 695 T3

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Phe Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Ala Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Tyr Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 6

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 6

ES 2 686 695 T3

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

<210> 7
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>

<223> aislado de librería

<400> 7

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln Gly
 85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Leu Ala Pro
 145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
 180 185 190

ES 2 686 695 T3

Tyr Ile Asp Thr Pro Leu Thr Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 8

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 8

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Ser Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

ES 2 686 695 T3

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Ala Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Ala Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Val Ile Asp Thr Pro Leu Ala Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 9

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 9

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

10 Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

ES 2 686 695 T3

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

<210> 10

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 10

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 11

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 11

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Met Gly
85 90 95

Val Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

10 Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

ES 2 686 695 T3

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Val Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Pro Ile Asp Thr Pro Leu Thr Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 12

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 12

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 13

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 13

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln Gly
85 90 95

Lys Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Leu Ala Pro
145 150 155 160

ES 2 686 695 T3

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Ala Ile Asp Thr Pro Leu Thr Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 14

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 14

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

10 Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

ES 2 686 695 T3

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Met Gly
85 90 95

Lys Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Phe Gly Leu Val Ser Leu Pro Thr Ser Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Ala Ile Asp Thr Pro Leu Ala Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 15

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 15

ES 2 686 695 T3

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

<210> 16
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>

<223> aislado de librería

<400> 16

```

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1          5          10          15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
          20          25          30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Cys Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
          35          40          45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50          55          60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65          70          75          80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Met Gly
          85          90          95

Ala Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
          100          105          110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
          115          120          125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
          130          135          140

Asn Thr Ser Ser Ile Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Gln Ala Pro
145          150          155          160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
          165          170          175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
          180          185          190

Tyr Ile Asp Thr Pro Leu Ile Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
          195          200          205
    
```

ES 2 686 695 T3

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 17

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 17

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Met Gly
85 90 95

Asn Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

10 Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

ES 2 686 695 T3

Asn Thr Ser Ser Ile Ala Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Leu Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Ala Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 18

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 18

ES 2 686 695 T3

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

<210> 19

ES 2 686 695 T3

<211> 254
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> aislado de librería

<400> 19

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Met Gly
 85 90 95

Val Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Ala Gly Leu Val Ser Leu Pro Thr Gln Ala Pro
 145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175

ES 2 686 695 T3

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Phe Ile Asp Thr Pro Leu Ala Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 20

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de la librería

10 <400> 20

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln Gly
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

ES 2 686 695 T3

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Val Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Val Ile Asp Thr Pro Leu Ile Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 21

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 21

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Ser Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

ES 2 686 695 T3

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Met Gly
85 90 95

Tyr Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Leu Gly Leu Val Ser Phe Pro Thr Leu Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Ala Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 22

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 22

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 23

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 23

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Met Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

ES 2 686 695 T3

Asn Thr Ser Ser Ile Leu Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Val Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Phe Ile Asp Thr Pro Leu Thr Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 24

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> aislado de librería

<400> 24

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

<210> 25
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> aislado de librería

<400> 25

10

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30

15

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60

20

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln Gly
 85 90 95

Val Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110

25

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Ser Gly Leu Val Ser Gly Pro Thr Pro Ala Pro
 145 150 155 160

ES 2 686 695 T3

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Val Ile Asp Thr Pro Leu Thr Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

210> 26

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 26

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Met Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

ES 2 686 695 T3

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Ala Gly Leu Val Ser Phe Pro Thr Ser Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Ala Ile Asp Thr Pro Leu Thr Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 27

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 27

ES 2 686 695 T3

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Ser Gly
85 90 95

Glu Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Ala Gly Leu Val Ser Leu Pro Thr Leu Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Val Ile Asp Thr Pro Leu Thr Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 28

5 <211> 254

<212> PRT

<213> artificial

<220>

5 <223> aislado de librería

<400> 28

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Ser Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

10

ES 2 686 695 T3

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Leu Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Val Ile Asp Thr Pro Leu Ala Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 29

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 29

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 30

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 30

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Ser Gly
85 90 95

Ala Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Ala Gly Leu Val Ser Leu Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

ES 2 686 695 T3

Phe Ile Asp Thr Pro Leu Ala Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 31

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> aislado de librería

<400> 31

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Ser Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

ES 2 686 695 T3

Asn Thr Ser Ser Ile Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Leu Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Thr Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 32

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 32

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala

ES 2 686 695 T3

	100		105		110
	Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu				
	115		120		125
	Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val				
	130		135		140
	Asn Thr Ser Ser Ile Phe Gly Leu Val Ser Lys Pro Thr Ser Ala Pro				
	145		150		155 160
	Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala				
		165		170	175
	Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly				
		180		185	190
	Pro Ile Asp Thr Pro Leu Phe Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp				
		195		200	205
	Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu				
		210		215	220
	Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile				
	225		230		235 240
	Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val				
		245		250	
	<210> 33				
	<211> 254				
	<212> PRT				
5	<213> artificial				
	<220>				
	<223> aislado de librería				
10	<400> 33				
	Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala				
	1		5		10 15
	Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala				
		20		25	30
	Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala				
		35		40	45
	Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp				
	50		55		60

ES 2 686 695 T3

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Glu Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Ala Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Leu Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Val Ile Asp Thr Pro Leu Thr Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 34

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> aislado de librería

<400> 34

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

ES 2 686 695 T3

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Met Gly
 85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Ala Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Leu Ala Pro
 145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
 180 185 190

Val Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
 195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
 210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
 225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
 245 250

	<210> 35
	<211> 254
	<212> PRT
5	<213> artificial
	<220>
	<223> aislado de librería
10	<400> 35

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 36

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 36

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Ala Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

ES 2 686 695 T3

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Ala Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 37

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 37

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80
Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Gly
85 90 95

Val Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val

ES 2 686 695 T3

130	135	140
Asn Thr Ser Ser Ile Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Ser Ala Pro 145	150	155 160
Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala 165	170	175
Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly 180	185	190
Ala Ile Asp Thr Pro Leu Ile Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp 195	200	205
Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu 210	215	220
Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile 225	230	235 240
Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val 245	250	

- <210> 38
- <211> 254
- 5 <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- <223> aislado de librería
- 10 <400> 38

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

<210> 39
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> aislado de librería

<400> 39
 Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30

10

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45
 Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
 85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Gln Ala Pro
 145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
 180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
 195 200 205

ES 2 686 695 T3

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 40

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> aislado de librería

<400> 40

ES 2 686 695 T3

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

<210> 41
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> aislado de librería

<400> 41
 Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30
 Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45
 Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60
 Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
 85 90 95
 Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110
 Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125
 Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140
 Asn Thr Ser Ser Leu Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Gln Ala Pro
 145 150 155 160
 Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175
 Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
 180 185 190
 Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
 195 200 205

10

ES 2 686 695 T3

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 42

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> aislado de librería

<400> 42

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Met Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala

ES 2 686 695 T3

165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 43
 <211> 254
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> aislado de librería

10 <400> 43
 Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45
 Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

ES 2 686 695 T3

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Gly Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

210> 44

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 44

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

ES 2 686 695 T3

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Thr Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 45

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 45

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

ES 2 686 695 T3

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Gln Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 46

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10

<400> 46

ES 2 686 695 T3

```

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1          5          10          15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
          20          25          30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
          35          40          45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
          50          55          60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65          70          75          80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
          85          90          95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
          100          105          110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
          115          120          125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
          130          135          140

Asn Thr Ser Ser Ala Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Gln Ala Pro
145          150          155          160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
          165          170          175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
          180          185          190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
          195          200          205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
          210          215          220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225          230          235          240
Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
          245          250

```

<210> 47

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

5

<400> 47

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
 85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Gln Ala Pro
 145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
 180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp

ES 2 686 695 T3

	195		200		205
	Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu				
	210		215		220
	Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile				
	225		230		235 240
	Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val				
		245		250	
	<210> 48				
	<211> 254				
	<212> PRT				
5	<213> artificial				
	<220>				
	<223> aislado de librería				
10	<400> 48				
	Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala				
	1	5		10	15
	Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala				
		20		25	30
	Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala				
		35		40	45
	Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp				
		50		55	60
	Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala				
		65		70	75 80
	Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly				
		85		90	95
	Pro Thr Gly Leu Ile Gly Glu Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala				
		100		105	110

ES 2 686 695 T3

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 49

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 49

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

ES 2 686 695 T3

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

<210> 50

<211> 254

5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10

<400> 50

ES 2 686 695 T3

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60
Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190
Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Gly Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 51

5 <211> s54

<212> PRT

<213> artificial

<220>

5 <223> aislado de librería

<400> 51

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

ES 2 686 695 T3

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Phe Gly Leu Val Ser Ser Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Arg Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 52

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 52

15

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

	225		230		235		240									
	Thr	Gly	Ser	Gln	His	Val	Val	Asp	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Val		
					245					250						
	<210> 53															
	<211> 254															
	<212> PRT															
5	<213> artificial															
	<220>															
	<223> aislado de librería															
10	<400> 53															
	Met	Ala	Thr	Gln	Phe	Asp	Gly	Lys	Thr	Ala	Leu	Ile	Thr	Gly	Gly	Ala
	1				5					10					15	
	Ser	Gly	Ile	Gly	Tyr	Ala	Val	Ala	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Glu	Gly	Ala
				20					25					30		
	Ser	Val	Val	Val	Gln	Asp	Val	Arg	Leu	Glu	Ala	Ala	Gln	Gln	Val	Ala
				35				40					45			
	Asp	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	Gly	Asp
	50						55					60				
	Val	Gly	Lys	Pro	Glu	Asp	Val	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Ala
	65					70					75				80	
	Ala	Tyr	Gly	Ala	Leu	His	Leu	Ala	Val	Asn	Asn	Ala	Gly	Ile	Gly	Gly
					85					90					95	
	Pro	Thr	Gly	Leu	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asp	Gly	Phe	Ala	Ala
				100					105					110		
	Tyr	Arg	Lys	Leu	Ile	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Ser	Val	Tyr	Tyr	Gly	Leu
			115					120					125			
	Arg	Tyr	Glu	Ile	Pro	Ala	Ile	Ile	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Ser	Ile	Val
	130						135					140				
	Asn	Thr	Ser	Ser	Ile	Phe	Gly	Leu	Val	Ser	Ser	Pro	Thr	Gln	Ala	Pro
	145					150					155				160	
	Tyr	Thr	Thr	Ala	Lys	His	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Thr	Lys	Ala	Ala	Ala
					165					170					175	
	Ala	Gly	Tyr	Ala	Ser	Gln	Gly	Val	Arg	Ile	Asn	Ser	Val	His	Pro	Gly
				180					185					190		

ES 2 686 695 T3

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 54

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 54

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

ES 2 686 695 T3

Asn Thr Ser Ser Ile Phe Gly Leu Val Gly Ser Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 55

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 55

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Val Arg Leu Glu Gly Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

ES 2 686 695 T3

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Phe Gly Leu Val Gly Ser Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Gly Met Pro Lys Glu Ala Leu Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 56

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 56

ES 2 686 695 T3

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Val Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Phe Gly Leu Val Gly Ser Pro Tyr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Met Pro Lys Glu Ala Arg Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

ES 2 686 695 T3

<210> 57
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> aislado de librería
 <400> 57
 10 Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30
 Ser Val Val Val Gln Asp Val Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45
 Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60
 Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
 85 90 95
 Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110
 Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125
 Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140
 Asn Thr Ser Ser Val Phe Gly Leu Val Gly Ser Pro Thr Gln Ala Pro
 145 150 155 160
 Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175
 Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
 180 185 190

ES 2 686 695 T3

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Gly Met Pro Lys Glu Ala Leu Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 58

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 58

ES 2 686 695 T3

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

<210> 59

<211> 254
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> aislado de librería

<400> 59

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Val Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
 85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Phe Gly Leu Val Gly Ser Pro Thr Trp Ala Pro
 145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175

10

ES 2 686 695 T3

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Met Pro Lys Glu Ala Arg Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 60

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 60

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

ES 2 686 695 T3

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Ala Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 61

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 61

ES 2 686 695 T3

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly

ES 2 686 695 T3

85								90				95			
Pro	Thr	Gly	Leu	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asp	Gly	Phe	Ala	Ala
			100				105						110		
Tyr	Arg	Lys	Leu	Ile	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Ser	Val	Tyr	Tyr	Gly	Leu
			115				120						125		
Arg	Tyr	Glu	Ile	Pro	Ala	Ile	Ile	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Ser	Ile	Val
			130				135						140		
Asn	Thr	Ser	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Val	Ser	Glu	Pro	Thr	Ala	Ala	Pro
			145				150						155	160	
Tyr	Thr	Thr	Ala	Lys	His	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Thr	Lys	Ala	Ala	Ala
			165							170			175		
Ala	Gly	Tyr	Ala	Ser	Gln	Gly	Val	Arg	Ile	Asn	Ser	Val	His	Pro	Gly
			180							185			190		
Gly	Ile	Asp	Thr	Pro	Leu	Leu	Ala	Ala	Met	Pro	Lys	Glu	Ala	Tyr	Asp
			195				200						205		
Ala	Leu	Val	Ser	Lys	His	Pro	Ile	Gly	Arg	Leu	Gly	Thr	Ala	Glu	Glu
			210				215						220		
Val	Ala	His	Leu	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Ser	Asp	Lys	Ala	Ser	Phe	Ile
			225				230						235		
Thr	Gly	Ser	Gln	His	Val	Val	Asp	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Val		
			245						250						

<210> 62

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> aislado de librería

10 <400> 62

ES 2 686 695 T3

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

<210> 63
<211> 254
<212> PRT
<213> artificial
5
<220>
<223> aislado de librería

<400> 63

ES 2 686 695 T3

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

<210> 64
 <211> 254
 <212> PRT
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> aislado de librería

 10 <400> 64
 Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30

 Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45

 Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60

 Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80

 Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
 85 90 95

 Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110

 Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125

 Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140

 Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Gln Ala Pro
 145 150 155 160

 Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175

 Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
 180 185 190

 Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
 195 200 205

ES 2 686 695 T3

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 65

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 65

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Ala Ala Pro
145 150 155 160

ES 2 686 695 T3

Tyr Thr Ala Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

5 <210> 66
<211> 254
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> aislado de librería

<400> 66
Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

ES 2 686 695 T3

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Ala Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Ser Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 67

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 67

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

<210> 68
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> aislado de librería

10

<400> 68

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
 85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Gln Ala Pro
 145 150 155 160

Tyr Thr Ser Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
 180 185 190

ES 2 686 695 T3

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 69

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 69

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

<210> 70
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> aislado de librería

<400> 70

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
 85 90 95

Pro Gly Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Ala Ala Pro
 145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
 180 185 190

10

ES 2 686 695 T3

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 71

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> aislado de librería

<400> 71

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Gly Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Ala Ala Pro

ES 2 686 695 T3

145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 72

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

<400> 72

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

10 Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

ES 2 686 695 T3

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Ala Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Met Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 73

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> aislado de librería

<400> 73

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

ES 2 686 695 T3

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Ser Gly Leu Val Ser Leu Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 74

5 <211> 254

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> aislado de librería

<400> 74

15

ES 2 686 695 T3

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30

 Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45

 Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60

 Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80

 Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
 85 90 95

 Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
 100 105 110

 Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125

 Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140

 Asn Thr Ser Ser Val Ser Gly Leu Val Ser Asp Pro Thr Ser Ala Pro
 145 150 155 160

 Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175

 Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
 180 185 190

 Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
 195 200 205

 Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
 210 215 220

 Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
 225 230 235 240

 Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
 245 250

5
<210> 75
<211> 254
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> aislado de librería

<400> 75

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

<210> 76
<211> 254
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> aislado de librería

<400> 76
Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Ser Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly

10

ES 2 686 695 T3

	180		185		190
	Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp				
	195		200		205
	Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu				
	210		215		220
	Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile				
	225		230		235 240
	Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val				
		245		250	
	<210> 77				
	<211> 254				
	<212> PRT				
5	<213> artificial				
	<220>				
	<223> aislado de librería				
10	<400> 77				
	Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala				
	1	5	10	15	
	Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala				
		20	25	30	
	Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala				
		35	40	45	
	Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp				
	50	55	60		
	Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala				
	65	70	75	80	
	Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly				
		85	90	95	
	Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala				
		100	105	110	
	Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu				
		115	120	125	
	Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val				
	130	135	140		

ES 2 686 695 T3

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Ala Pro Thr Ser Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 78

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 78

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

ES 2 686 695 T3

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Asp Pro Thr Ser Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 79

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 79

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Thr Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

ES 2 686 695 T3

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

<210> 80

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> aislado de librería

<400> 80

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

<210> 81
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> aislado de librería

<400> 81
 Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
 20 25 30
 Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
 35 40 45
 Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
 50 55 60
 Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
 85 90 95
 Pro Gly Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Tyr Phe Ala Ala
 100 105 110
 Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Ile Tyr Tyr Gly Leu
 115 120 125
 Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
 130 135 140
 Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Gln Ala Pro
 145 150 155 160
 Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
 165 170 175
 Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
 180 185 190

10

ES 2 686 695 T3

Gly Ile Asp Thr Pro Met Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Gly Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Ile Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 82

<211> 254

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10

<400> 82

ES 2 686 695 T3

Met	Ala	Thr	Gln	Phe	Asp	Gly	Lys	Thr	Ala	Leu	Ile	Thr	Gly	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Gly	Ile	Gly	Tyr	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Glu	Gly	Ala	
			20					25					30			
Ala	Val	Val	Val	Gln	Asp	Leu	Arg	Leu	Glu	Ala	Ala	Gln	Gln	Val	Ala	
		35					40					45				
Asp	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	Gly	Asp	
	50					55					60					
Val	Gly	Lys	Pro	Glu	Asp	Val	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Ala	
65					70					75					80	
Ala	Tyr	Gly	Ala	Leu	His	Leu	Ala	Val	Asn	Asn	Ala	Gly	Ile	Gly	Gly	
				85					90					95		
Pro	Gly	Gly	Leu	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asp	Tyr	Phe	Ala	Ala	
			100					105					110			
Tyr	Arg	Lys	Leu	Ile	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Gly	Leu	
		115					120					125				
Arg	Tyr	Glu	Ile	Pro	Ala	Ile	Ile	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Ser	Ile	Val	
	130					135						140				
Asn	Thr	Ser	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Val	Ser	Glu	Pro	Thr	Gln	Ala	Pro	
145					150					155					160	
Tyr	Thr	Thr	Ala	Lys	His	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Thr	Lys	Ala	Ala	Ala	
				165					170					175		

ES 2 686 695 T3

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Met Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Gly Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Ile Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 83

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 83

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Thr Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ala Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Gly Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Ile Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

ES 2 686 695 T3

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Met Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Gly Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Ile Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 84

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 84

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

ES 2 686 695 T3

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Met Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Ile Ala Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Leu Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Thr Ile Asp Thr Pro Leu Ile Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 85

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 85

ES 2 686 695 T3

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

<210> 86
<211> 254
<212> PRT
<213> artificial
5
<220>
<223> aislado de librería

<400> 86
10

ES 2 686 695 T3

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

245	250
<210> 87	
<211> 254	
<212> PRT	
5 <213> artificial	
<220>	
<223> aislado de librería	
10 <400> 87	

ES 2 686 695 T3

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

ES 2 686 695 T3

<210> 88
<211> 254
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> aislado de librería

<400> 88
Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Val Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Phe Gly Leu Val Gly Ser Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

10

ES 2 686 695 T3

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Gly Met Pro Lys Glu Ala Arg Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 89

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 89

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Val Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Thr Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

ES 2 686 695 T3

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Phe Gly Leu Val Gly Ser Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Met Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Arg Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 90

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 90

ES 2 686 695 T3

Met	Ala	Thr	Gln	Phe	Asp	Gly	Lys	Thr	Ala	Leu	Ile	Thr	Gly	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Gly	Ile	Gly	Tyr	Ala	Val	Ala	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Glu	Gly	Ala	20	25	30	
Ser	Val	Val	Val	Gln	Asp	Leu	Arg	Leu	Glu	Ala	Ala	Gln	Gln	Val	Ala	35	40	45	
Asp	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	Gly	Asp	50	55	60	
Val	Gly	Lys	Pro	Glu	Asp	Val	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Ala	65	70	75	80
Ala	Tyr	Gly	Ala	Leu	His	Leu	Ala	Val	Asn	Asn	Ala	Gly	Ile	Ala	Gly	85	90	95	
Pro	Thr	Gly	Leu	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asp	Gly	Phe	Ala	Ala	100	105	110	
Tyr	Arg	Lys	Leu	Ile	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Ser	Val	Tyr	Tyr	Gly	Leu	115	120	125	
Arg	Tyr	Glu	Ile	Pro	Ala	Ile	Ile	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Ser	Ile	Val	130	135	140	
Asn	Thr	Ser	Ser	Thr	Leu	Gly	Leu	Val	Ser	Glu	Pro	Thr	Ala	Ala	Pro	145	150	155	160
Tyr	Thr	Thr	Ala	Lys	His	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Thr	Lys	Ala	Ala	Ala	165	170	175	

ES 2 686 695 T3

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Leu Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 91

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 91

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

15 Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

ES 2 686 695 T3

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Glu Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Ala Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Gly Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Met Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 92

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

ES 2 686 695 T3

<220>

<223> aislado de librería

<400> 92

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Thr Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Gly Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Tyr Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Ile Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

Gly Ile Asp Thr Pro Met Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
225 230 235 240

5

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
245 250

<210> 93

<211> 254

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> aislado de librería

10 <400> 93

Met Ala Thr Gln Phe Asp Gly Lys Thr Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Gln Ala Val Ala Leu Glu Leu Ala Ala Glu Gly Ala
20 25 30

Ser Val Val Val Gln Asp Leu Arg Leu Glu Ala Ala Gln Gln Val Ala
35 40 45

Asp Glu Ile Thr Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ile Ala Val Ala Gly Asp
50 55 60

Val Gly Lys Pro Glu Asp Val Lys Ala Ala Val Asp Ala Ala Val Ala
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Pro Gly Gly Leu Ile Gly Asp Tyr Asp Asp Ser Asp Tyr Phe Ala Ala
100 105 110

Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Ile Tyr Tyr Gly Leu
115 120 125

Arg Tyr Glu Ile Pro Ala Ile Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ile Val
130 135 140

Asn Thr Ser Ser Val Leu Gly Leu Val Ser Glu Pro Thr Gln Ala Pro
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Ala Lys His Gly Val Ala Gly Leu Thr Lys Ala Ala Ala
165 170 175

Ala Gly Tyr Ala Ser Gln Gly Val Arg Ile Asn Ser Val His Pro Gly
180 185 190

ES 2 686 695 T3

Gly Ile Asp Thr Pro Met Leu Ala Ala Met Pro Lys Glu Gly Tyr Asp
 195 200 205

Ala Leu Val Ser Lys His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ala Glu Glu
 210 215 220

Val Ala His Leu Val Thr Phe Leu Leu Ser Asp Lys Ala Ser Phe Ile
 225 230 235 240

Thr Gly Ser Gln His Val Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Val
 245 250

Reivindicaciones

- 5 1. Cetorreductasa que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 2, donde la cetorreductasa es capaz de reducir estereoselectivamente 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo.
2. Cetorreductasa según la reivindicación 1, que
 - (i) convierte isopropanol en acetona a una tasa de 0,01-100 U/mg de liofilizado de cetorreductasa; y/o
 - 10 (ii) después de incubación durante 48 h en isopropanol acuoso al 50% a 30°C muestra una actividad residual de como mínimo un 1% con respecto a su actividad antes de la incubación.
- 15 3. Cetorreductasa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 95% de identidad con las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 o 93.
- 20 4. Procedimiento para la:
 - reducción de un sustrato ceto a un alcohol secundario.
 - reducción de un sustrato aldehído a un alcohol primario.
 - oxidación de un sustrato de alcohol secundario a un producto ceto.
 - oxidación de un sustrato de alcohol primario a un aldehído, y/o
 - oxidación de un sustrato aldehído a un ácido carboxílico.

donde el procedimiento comprende el paso de hacer reaccionar el sustrato y un cofactor apropiado en presencia de una cetorreductasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, donde
 - (i) el sustrato es 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo, que se reduce estereoselectivamente a (3S)-4-cloro-3-hidroxibutanoato de etilo con una cetorreductasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
 - (ii) el sustrato es (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, que se reduce estereoselectivamente a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxi-hexanoato de terc-butilo con una cetorreductasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91;
 - 30 (iii) el sustrato es N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina, que se reduce estereoselectivamente a (1S)-3-(dimetilamino)-1-(2-tienil)-propan-1-ol con una cetorreductasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58;
 - 35 (iv) el sustrato es (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato, que se reduce estereoselectivamente a (3R,5S)-6-cloro-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo con una cetorreductasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 o 91;
 - (v) el sustrato es etilsecodiona (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14,17-diona), que se reduce estereoselectivamente a 17-β-seconol (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14-ona-17-β-ol) con una cetorreductasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 o
 - 40 (vi) el sustrato es N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina, que se reduce estereoselectivamente a (1S)-3-(metilamino)-1-(2-tienil)-propan-1-ol con una cetorreductasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 u 87.
- 45 6. Uso de una cetorreductasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para:
 - la reducción de un sustrato ceto a un alcohol secundario,
 - la reducción de un sustrato aldehído a un alcohol primario,
 - la oxidación de un sustrato alcohol secundario a un producto ceto,
 - la oxidación de un sustrato alcohol primario a un aldehído, y/o
 - 50 – la oxidación de un sustrato aldehído a un ácido carboxílico.

7. Uso según la reivindicación 6, donde:

- 5 (i) el sustrato es 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo, que se reduce estereoselectivamente a (3S)-4-cloro-3-hidroxi-butanoato de etilo con una cetorreductasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- (ii) el sustrato es (5R)-6-ciano-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo, que se reduce estereoselectivamente a (3R,5R)-6-ciano-3,5-dihidroxi-hexanoato de terc-butilo con una cetorreductasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91;
- 10 (iii) el sustrato es N,N-dimetil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina, que se reduce estereoselectivamente a (1S)-3-(dimetilamino)-1-(2-tienil)-propan-1-ol con una cetorreductasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58;
- (iv) el sustrato es (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato, que se reduce estereoselectivamente a (3R,5S)-6-cloro-3,5-dihidroxi-hexanoato de terc-butilo con una cetorreductasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 o 91;
- 15 (v) el sustrato es etilsecodiona (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14,17-diona), que se reduce estereoselectivamente a 17-β-seconol (etil-3-metoxi-8,14-secogona-1,3,5(10),9(11)-tetraeno-14-ona-17-β-ol) con una cetorreductasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 o
- 20 (vi) el sustrato es N-monometil-3-ceto-3-(2-tienil)-1-cetopropanoamina, que se reduce estereoselectivamente a (1S)-3-(metilamino)-1-(2-tienil)-propan-1-ol con una cetorreductasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 u 87.