(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 689 941**

(51) Int. CI.:

C12N 9/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2010 PCT/EP2010/055564**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2010 WO10122175**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2010 E 10715251 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2421962**

(54) Título: **Esterasas de hígado de cerdo mejoradas**

(30) Prioridad:

24.04.2009 EP 09158759

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2018

(73) Titular/es:

PATHEON AUSTRIA GMBH & CO KG (100.0%)
St.-Peter-Strasse 25
4020 Linz, AT

(72) Inventor/es:

KIETZMANN, MARTIN;
PICHLER, HARALD;
SCHWAB, HELMUT;
EL-HELIEBI, AMIN;
BRAUN, ANDREAS y
WINKLER, CHRISTINE

(74) Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Esterasas de hígado de cerdo mejoradas

La invención se refiere a polipéptidos mutantes aislados que tienen actividad de esterasa y que tienen una concentración aumentada de la fracción del polipéptido que está presente como una proteína activa y soluble en un lisado aclarado del polipéptido expresado en E. coli con respecto al polipéptido sin ciertas mutaciones en su secuencia de aminoácidos. La invención también se refiere a secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican las esterasas de hígado de cerdo mutantes y al uso de los polipéptidos mutantes de acuerdo con la invención.

Las esterasas de hígado de cerdo (PLE) se conocen como una clase muy útil de hidrolasas, por ejemplo, son muy útiles en la hidrólisis enantioselectiva de los ésteres. El hecho de que se consideren útiles es bastante sorprendente, ya que ha habido graves inconvenientes para el uso de PLE, un lisado en bruto aislado de hígado de cerdo. (i) Existen diversas isoenzimas que tienen diferentes propiedades y la enantioselectividad puede, por lo tanto, cambiar de un lote a otro y también puede cambiar con el tiempo de reacción debido a las diferencias en la estabilidad operativa. (ii) El riesgo de contaminación viral o priónica del extracto en bruto de hígado de cerdo es una preocupación importante en la industria farmacéutica. (iii) Además, los productos fabricados con la ayuda de PLE podrían no considerarse Kosher o Halal.

Debido a estas limitaciones, se conocen diversos esfuerzos para producir de forma recombinante iso-enzimas de hígado de cerdo. Si bien inicialmente la levadura metilotrófica Pichia pastoris parecía ser un buen sistema de expresión para las esterasas de hígado de cerdo, al final, Escherichia coli demostró ser un mejor huésped después de la mejora del huésped específico, el gen y los sistemas de expresión que contribuyen a corregir el plegamiento enzimático.

La solicitud de patente internacional WO 2009/004093 describe la expresión de esterasa de hígado de cerdo en E. coli. La solicitud de patente internacional WO 2008/116745 describe un polipéptido que tiene actividad esterasa, estando dicho polipéptido presente como una proteína activa y soluble en un lisado aclarado de dicho polipéptido que expresa E. coli.

Hermann et. al., J. Biotechnol., 2007, 133(3), 301-303, el documento WO 2004/055177 y el documento WO 02/48322 describen que la PLE es activa como multímero, formando preferiblemente una estructura cuaternaria trimérica activa.

El documento WO 2007/073845 describe el uso de esterasas en un proceso para la fabricación de agentes reductores de la presión sanguínea.

Dado que las PLE son tales enzimas útiles, sigue existiendo la necesidad de mejorar adicionalmente los niveles de actividad que pueden conseguirse con la enzima.

Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que los niveles de expresión y, por lo tanto, los niveles de actividad de mutantes de iso-forma de esterasa de hígado de cerdo y esterasas homólogas expresadas en E. coli pueden mejorarse significativamente sustituyendo uno o más residuos en su secuencia de aminoácidos, concretamente, uno o más de los aminoácidos responsables de la formación del multímero de la esterasa del hígado de cerdo, por un aminoácido que no produce o reduce la tendencia a la formación del multímero, cambiando de este modo la estructura cuaternaria de la PLE.

El hallazgo se desencadenó mediante la preparación de una mutación en la posición 788 del Marco de Lectura Abierta que codifica APLE (SEQ ID NO 1), que corresponde a la posición de nucleótido 5541 en la SEQ ID NO 1, por lo que el reemplazo fue T-> A, que conduce al reeemplazo de la valina hidrófoba en la enzima APLE por un ácido aspártico cargado negativamente: V263D. Un modelo informático indicó que esta mutación estaba localizada en una hélice en el extremo exterior de la enzima, por lo tanto, lejos de la cavidad del sitio activo de la enzima, mientras que también se encontró que la actividad total de esta enzima mutada hacia el éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico aumentó de 6,5 a 11,6 Unidades/mg de proteína soluble total. En el caso de 3-(3,4-diclorofenil)-glutarato de dimetilo, la actividad aumentó de 36 a 42 mU/mg de proteína soluble total y en el caso de acetato de para-nitrofenilo, la actividad aumentó de 15,4 a 24,3 U/mg de proteína soluble total. Al principio, no había ninguna explicación de por qué una mutación en una región externa de APLE tendría un efecto tan fuerte sobre diversas conversiones. Sin embargo, el análisis de la estructura del homólogo humano hCE1 identificó a la valina en la posición 263 de APLE como potencialmente importante para la multimerización. Tras introducir un ácido aspártico

cargado, en cambio, la interacción hidrófoba que existía anteriormente, la interacción estabilizadora entre dos subunidades, se altera. Un aminoácido cargado negativamente puede repeler la otra subunidad en lugar de unirla a través de la interacción hidrófoba.

A continuación, se probó la hipótesis de que la formación de multímeros se interrumpe por un cambio introducido por el ácido aspártico en la posición 263 que interrumpe las interacciones hidrófobas y, por lo tanto, conduce a la formación de monómeros. Al analizar un modelo informático de APLE, se concluyó que la valina en la posición 263 de un monómero puede interactuar con la leucina en la posición 43 de otro monómero. Se postuló que la formación de trímeros se debe, al menos en parte, a la interacción hidrófoba alterna de L43 y V263 entre tres subunidades en total. Por lo tanto, independientemente de qué aminoácido se reemplaza por ácido aspártico, la interacción debe interrumpirse. Probando la hipótesis, la leucina en la posición 43 se reemplazó por ácido aspártico, lo que resultó en la monomerización.

Esta mutación también dio lugar a la formación de monómeros, por lo tanto, demostró que el reemplazo de aminoácidos en ciertas posiciones de un monómero de PLE, que sin el reemplazo puede formar un multímero, aumenta la cantidad de enzima presente en la forma monomérica, y aunque la variante L43D produjo menos proteína soluble que la variante V263D, es evidente que la actividad encontrada para una cierta cantidad de lisado aclarado que comprende enzimas mutadas en una posición involucrada en la formación de multímero y usada para una cierta conversión aumentó con respecto a la misma cantidad de lisado aclarado que comprendía enzimas sin mutaciones usadas para la misma conversión. La misma mutación se introdujo en todos los polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, y dio como resultado el mismo efecto.

Por lo tanto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de esterasa que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 o un homólogo de las mismas, que comprende una sustitución o eliminación de aminoácidos de uno o más aminoácidos como se muestra en dichas SEQ ID NOs y que da como resultado un polipéptido mutante que tiene una concentración aumentada de la fracción del polipéptido mutante que está presente como una proteína activa y soluble en una lisado aclarado del polipéptido mutante expresado en E. coli en relación con la concentración de la fracción del polipéptido sin que la mutación esté presente como una proteína activa y soluble en el lisado aclarado del polipéptido sin la una o más deleciones o sustituciones expresadas en E. coli en las mismas condiciones.

Se prefiere sustituir uno o más de los aminoácidos en lugar de eliminar uno o más aminoácidos. En este texto, la actividad relativa de la esterasa es una comparación de las actividades de tipo salvaje (es decir, la enzima parental no mutagenizada) y la enzima mutante respectiva que se prepararon (véase en la sección de Materiales y métodos bajo el encabezado "Expresión y cosecha de células"; donde se describe la preparación de lisado aclarado y donde, en "Cuantificación de la actividad de PLE" se describen los métodos para medir la actividad) en las mismas condiciones usando la misma cantidad de la preparación de proteína soluble (lisado aclarado). La actividad relativa (r [%]) se calcula mediante la liberación de para-nitrofenol por minuto del lisado mutante ([p-NPAmut]) dividida por la liberación de para-nitrofenol por minuto del correspondiente lisado de tipo salvaje ([p-NPAwt]) multiplicado por el 100 % de acuerdo con la fórmula r = ([p-NPAmut]/[p-NPAwt]) x 100 %.

En una realización, la invención se refiere a un polipéptido aislado de acuerdo con la invención, cuyo polipéptido muestra un aumento del 10% en la actividad de la esterasa en comparación con la actividad de la esterasa del polipéptido de tipo salvaje correspondiente sin deleción o sustitución de aminoácidos.

Las enzimas tienen una estructura primaria (secuencia de aminoácidos), secundaria (principalmente hélice alfa y lámina beta) y terciaria (estructura de una cadena peptídica). Además, algunas enzimas forman estructuras cuaternarias que son conglomerados (multímeros) de las mismas (homo) o diferentes (hetero) subunidades (cadenas peptídicas). Las esterasas de hígado de cerdo son homo trímeros. La estructura cuaternaria de las enzimas y los mutantes se puede ensayar mediante centrifugación en gradiente de densidad de glicerol (véase el Ejemplo 3 para una descripción de Centrifugación en gradiente de densidad de glicerol) y electroforesis en gel nativo (véase en la sección Materiales y métodos bajo el encabezado "Electroforesis en gel nativo" para una descripción del método).

La formación de multímeros suele ser causada por múltiples fuerzas de atracción intermoleculares de diferentes aminoácidos, tales como interacciones hidrófobas/hidrófobas o iónicas (positivas/negativas) de las diferentes subunidades (monómeros). Dichas interacciones son a menudo enzimas estabilizadoras y, por lo tanto, a menudo son beneficiosas para las enzimas. En la presente invención se encontró sorprendentemente que la destrucción de solo unas pocas de tales fuerzas de atracción conducía a una estructura cuaternaria modificada y actividades

relativas más altas de PLE y enzimas homólogas en lisados aclarados.

Por lo tanto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de esterasa que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 o un homólogo de las mismas, que comprende una sustitución o eliminación de aminoácidos de uno o más aminoácidos como se muestra en dichas SEQ ID NOs, en donde al menos una sustitución o eliminación de aminoácidos ha tenido lugar en una posición de aminoácidos que se encuentra en un punto de interacción de monómeros cuando los monómeros están formando multímeros y que destruye ese punto de interacción entre los monómeros, y que da como resultado un polipéptido mutante que tiene una concentración aumentada de la fracción del polipéptido mutante que está presente como una proteína activa y soluble en una lisado aclarado del polipéptido mutante expresado en E. coli en relación con la concentración de la fracción del polipéptido sin que la mutación esté presente como una proteína activa y soluble en el lisado aclarado del polipéptido sin la una o más deleciones o sustituciones expresadas en E. coli en las mismas condiciones. Preferiblemente, la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de esterasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, y polipéptidos aislados que tienen una identidad de aminoácidos de al menos más del 90%, preferiblemente más del 95% de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, y donde al menos una sustitución o eliminación de aminoácidos ha tenido lugar en una posición de aminoácido que se encuentra en un punto de interacción de monómeros cuando los monómeros forman multímeros y que destruye ese punto de interacción entre los monómeros. Preferiblemente, la sustitución o eliminación se ha llevado a cabo en una o más posiciones seleccionadas del grupo de las posiciones de aminoácidos 43, 260, 263, 266 o 270, o posiciones correspondientes a las mismas. Las sustituciones preferidas son L43D, T260P, T260A, V263D y V263G o posiciones correspondientes a las mismas.

En particular, la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de esterasa que comprende una secuencia de aminoácidos con más del 90% de identidad con la secuencia mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, en el que al menos una sustitución o eliminación de aminoácido ha tenido lugar en una posición de aminoácido que se localiza en un punto de interacción de monómeros cuando los monómeros están formando multímeros, y que destruye ese punto de interacción entre los monómeros, dando como resultado una mayor cantidad de polipéptido mutante presente en la forma monomérica en comparación con el polipéptido correspondiente sin mutación, y como resultado, en un polipéptido mutante que tiene una concentración aumentada de la fracción del polipéptido mutante que está presente como una proteína activa y soluble en lisado aclarado del polipéptido mutante expresado en E. coli en relación con la concentración de la fracción del polipéptido sin que la mutación esté presente como una proteína activa y soluble en el lisado aclarado del polipéptido sin la una o más deleciones o sustituciones expresadas en E. coli en las mismas condiciones, en donde el polipéptido aislado muestra un aumento de al menos el 10% en la actividad de la esterasa en comparación con la actividad de la esterasa del polipéptido de tipo salvaje correspondiente sin deleción o sustitución de amino ácidos en donde la sustitución o eliminación se ha llevado a cabo en una o más posiciones seleccionadas del grupo de las posiciones de aminoácidos 260, 263, y posiciones correspondientes a las mismas.

En particular, la invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de esterasa, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 o un homólogo de la misma, que tiene una identidad de aminoácidos de más del 90%, preferiblemente más del 95%, más preferiblemente más del 97%, mucho más preferiblemente más del 98% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo de posiciones 43, 260, 263 o posiciones correspondientes a las mismas, preferiblemente estas sustituciones se seleccionan del grupo de sustituciones L43D, T260P, T260A, V263D, V263G o posiciones correspondientes a las mismas. En el marco de esta invención, los porcentajes de identidad (u homología) se determinaron o pueden determinarse como se describe en Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250, usando los siguientes parámetros estándar en
http://www.ncbi.nim.nih.gov/BLAST/bi2seg/wblast2.cgi

- para secuencias de proteínas:

Matriz: BLOSUM62
Hueco abierto: 5
hueco de extensión: 2
Penalizaciones de huecos x_dropoff: 11
Esperado: 10

tamaño de palabra: 11

- para nucleótidos:

Recompensa para correspondencia: 1
Penalización por falta de correspondencia: -2
Hueco abierto: 11
hueco de extensión: 1
Penalizaciones de huecos x_dropoff: 50
Esperado: 10
tamaño de palabra: 3

Las posiciones que pueden dirigirse para destruir las fuerzas de atracción de diferentes monómeros pueden identificarse mediante el análisis de estructuras de rayos X de PLE o enzimas homólogas (por ejemplo, carboxilesterasa 1 de hígado humano, entrada PDB 1MX1 o la carboxilesterasa 1 de hígado de conejo, entrada PDB 1K4Y) o por experimentos de mutagénesis al azar. Las posiciones de aminoácidos preferidas para dirigir sustituciones son las posiciones 43, 260 y 263, y los aminoácidos de otras subunidades que interactúan con estos aminoácidos. Después de identificar las posiciones de aminoácidos que contribuyen a la estructura cuaternaria utilizando los métodos conocidos, se eligen sustituciones de aminoácidos para destruir las fuerzas de atracción. Las sustituciones preferidas son el intercambio de residuos hidrófobos, por ejemplo, Alanina (abreviada como Ala o A), Valina (abreviada como Val o V), Isoleucina (abreviada como Ile o I), Leucina (abreviada como Leu o L), Metionina (abreviada como Met o M), Fenilalanina (abreviada como Phe o F), Triptófano (abreviado como Trp o W), Cisteína (abreviada como Cys o C), Prolina (abreviada como Pro o P), con menos aminoácidos hidrófobos o hidrófilos, por ejemplo Lisina (abreviada como Lys o K), Arginina (abreviada como Arg o R), Ácido aspártico (abreviado como Asp o D), Ácido glutámico (abreviado como Glu o E), Serina (abreviada como Ser o S), Tirosina (abreviada como Tyr o Y), Treonina (abreviada como Thr o T), Glicina (abreviada como Gly o G), Histidina (abreviada como His o H), Glutamina (abreviada como Gln o Q), Asparagina (abreviada como Asn o N) y viceversa. Otras sustituciones de aminoácidos preferidas tienen como objetivo la destrucción de las fuerzas iónicas mediante la sustitución de aminoácidos cargados positivamente (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) con aminoácidos cargados negativamente (por ejemplo, ácido aspártico o ácidos glutámicos) o viceversa.

Por lo tanto, una mutación preferida es el reemplazo de L43 con cualquier aminoácido elegido del grupo de K, R, D, E, S, Y, T, G, H, Q y N. Otra mutación preferida es el reemplazo de T260 con cualquier aminoácido elegido del grupo de A, V, I, L, M, F, W, C y P. Otra mutación preferida es H266 con cualquier aminoácido elegido del grupo de A, V, I, L, M, F, W, C y P y D y E. Otra mutación preferida es el reemplazo de Q270 con cualquier aminoácido elegido del grupo de A, V, I, L, M, F, W, C y P. Todas las mutaciones se describen en relación con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14.

Se prefieren particularmente las siguientes mutaciones, basadas en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14: V263D, L43D, T260P y T260A.

Se entenderá por un experto en la técnica que también son posibles una o más combinaciones de las mutaciones descritas, siempre que los reemplazos no den como resultado una secuencia de aminoácidos que permita una mayor formación de multímeros en relación con la cantidad de formación de multímero antes de que ocurra la mutación.

Como se sabe, la numeración de los aminoácidos depende de la especie de la cual se origina la proteína. La numeración también puede cambiar como resultado de eliminaciones o inserciones. Es sabido, sin embargo, por un experto cómo alinear secuencias. Por lo tanto, en este texto, la frase "o correspondiente a las mismas" se usa para describir las posiciones de aminoácidos que, salvo el número, son las mismas que las posiciones 43, 260 y 263 en la SEQ ID NO 1.

Los polipéptidos aislados de la invención pueden comprender, además de las mutaciones que disminuyen la formación de multímeros, una o más mutaciones adicionales, que mejoran la selectividad y/o la actividad hacia un sustrato deseado.

Por lo tanto, en una realización preferida, la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad esterasa, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 o un homólogo de las mismas que tiene una identidad de aminoácido de al menos más

del 90%, preferiblemente más del 95% de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 43, 260 y 263, o posiciones correspondientes a las mismas, y una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo de F234S y L238V. Incluso más preferidas en esta realización, las sustituciones de aminoácidos son una o más sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo de posición que comprende la posición 43, la posición 260 y la posición 263, o más específicamente seleccionadas del grupo de L43D, T260P, T260A, V263D y V263G.

La mutación F234S fue el resultado del reemplazo de T en la posición 701 del gen que codifica APLE por C. La mutación L238V fue el resultado del reemplazo de T por A en la posición 712 del gen que codifica APLE. Independientemente de las mutaciones que impiden la formación de multímeros, los mutantes de uno cualquiera de los polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 que comprenden al menos una de estas dos mutaciones, son muy útiles para la conversión de acetato de para-nitrofenilo y/o 3-(3,4-diclorofenil)-glutarato de dimetilo y/o para la resolución de éster metílico del ácido (4e)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico rac. Por lo tanto, la invención también se refiere a dichos polipéptidos.

Por lo tanto, la invención también se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad esterasa, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 o un homólogo de las mismas, que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 95% de identidad, preferiblemente el 97%, más preferiblemente el 98% con una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo de L238V y F234S. Preferiblemente, además de estar presentes las mutaciones L238V y/o F234S, las siguientes posiciones tienen los siguientes residuos de aminoácidos: en las posiciones 129, 133, 134, 138 y 139, los residuos son V, S, T, L y A, respectivamente. La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 que tienen al menos una mutación elegida de L238V y F234S. También es parte de la invención el uso de los polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 que tienen al menos una mutación elegida de L238V y F234S para la producción de un ácido, éster o alcohol, o más en particular para la conversión de acetato de para-nitrofenilo, o la resolución del éster metílico del ácido (4e)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico racémico o la conversión de 3-(3,4-diclorofenil)-glutarato de dimetilo.

La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos aislados de acuerdo con la invención. En particular, la invención se refiere a ácidos nucleicos que son las secuencias codificantes en las SEQ ID NOs 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 13 y homólogos de las mismas, preferiblemente con más del 80% de identidad, más preferiblemente más del 90%, incluso más preferible más del 95%, más preferiblemente más del 98% de identidad con los ácidos nucleicos que son las secuencias codificantes en las SEQ ID NOs 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 13.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de ácidos, ésteres o alcoholes, en el que se aplica un péptido aislado de acuerdo con la invención. Además, la invención se refiere a dicho proceso en el que se fabrican ácidos y/o ésteres α-alquilados, más específicamente un proceso en el que los ácidos α-alquilados ópticamente puros seleccionados de estos ácidos α-alquilados se reducen a sus alcoholes correspondientes. En un aspecto adicional, estos alcoholes se aplican adicionalmente como componentes básicos para miméticos de dipéptidos, siendo los miméticos de dipéptidos copias sintéticas de dipéptidos naturales. Además, la invención se refiere a la aplicación de estos componentes básicos en agentes reductores de la presión sanguínea.

La invención se refiere además a todas las combinaciones posibles de diferentes realizaciones y/o características preferidas de acuerdo con el péptido aislado, la secuencia de ácidos nucleicos, el uso del polipéptido y el proceso de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento.

Además, la invención se refiere a todas las realizaciones junto con las SEQ ID NOs 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13, en las que los polipéptidos están codificados por los Marcos de Lectura Abierta indicados en estas secuencias.

Materiales y métodos

Las técnicas generales para preparar polipéptidos y mutantes de los mismos se conocen en la técnica, y se pueden encontrar en, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (2001).

Preparación de E. coli que expresa APLE, yPLE, PICE, PLE2, PLE3, PLE4, PLE5 y mutantes correspondientes.

Los genes sintéticos γPLE, PICE, PLE2, PLE3, PLE4, PLE5 (véanse las SEQ ID NOs 4, 6, 8, 10, 12 o 14) se cortaron con NdeI e HindIII y se clonaron en los sitios de restricción de NdeI e HindIII de pCm470_DsbC_APLE-C8P que codifica APLE (véase la SEQ ID NO 2 y la Figura 1) usando técnicas de biología molecular estándar como se describe en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Manniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

pCm470_DsbC_APLE-C8P y los plásmidos derivados anteriormente que codifican APLE, γPLE, PICE, PLE2, PLE3, PLE4, PLE5 se transformaron en Origami B de E. coli (DE3).

Los mutantes de APLE, γPLE, PICE, PLE2, PLE3, PLE4, PLE5 se prepararon por mutagénesis de saturación de sitio usando el kit de mutagénesis de sitio dirigido QuikChange® (Catálogo N.º 200518) de Stratagene (Stratagene, 11011 North Torrey Pines Road La Jolla, CA 92037) de acuerdo con el MANUAL DE INSTRUCCIONES proporcionado usando los plásmidos descritos anteriormente que codifican APLE, γPLE, PICE, PLE2, PLE3, PLE4, PLE5 como plantillas.

Los ejemplos de cebadores de mutagénesis para mutagénesis de sitio dirigido se describen en las SEQ ID NOs 15-24. Los plásmidos mutantes resultantes de APLE, γPLE, PICE, PLE2, PLE3, PLE4, PLE5 se transformaron en Origami B de E. coli (DE3).

SeqID 15: Cebador L43D_F
5' GTCCCTTTTGCTAAGCCACCTGACGGATCTTTGAGGTTTGC 3'
SeqID 16: Cebador L43D_R
5' GCAAACCTCAAAGATCCGTCAGGTGGCTTAGCAAAAGGGAC 3'
SeqID 17: Cebador T260P_F
5' GCAGGATGCAAAACTACTCCTTCGGCAGTCTTCGTGC 3'
SeqID 18: Cebador T260P_R
5'GCACGAAGACTGCCGAAGGAGTAGTTTTGCATCCTGC 3'
SeqID 19: Cebador T260A_F
5'GCAGGATGCAAAACTACTGCTTCGGCAGTCTTCGTGC 3'
SeqID 20: Cebador T260A_R
5'GCACGAAGACTGCCGAAGCAGTAGTTTTGCATCCTGC 3'
SeqID 21: Cebador V263D_F
5' CTACTACTTCGGCAGACTTCGTGCATTGTTTGC 3'
SeqID 22: Cebador V263D_R
5' GCAAACAATGCACGAAGTCTGCCGAAGTAGTAG 3'
SeqID 23: Cebador V263G_F
5' CAAAACTACTACTTCGGCAGGGTTCGTGCATTGTTTGCGTC 3'
SeqID 24: Cebador V263G_R
5' GACGCAAACAATGCACGAACCCTGCCGAAGTAGTAGTTTTG 3'

Expresión y cosecha de células.

Todos los componentes de los medios y los antibióticos se compraron en Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Alemania). Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: Se inocularon 20 ml de medio LB de medio de cultivo previo (Lennox), que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol con colonias de E. coli recombinantes que expresan APLE, γPLE, PICE, PLE2, PLE3, PLE4, PLE5 y mutantes correspondientes (preparación véase más arriba) y se incubaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml a 28 °C y a 200 rpm durante una noche (18 h). Se utilizaron 10 ml del mismo para inocular 500 ml de medio LB de medio de cultivo principal (Lennox), que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol) en matraces de agitación con deflector de 2 l. El cultivo principal se incubó a 28 °C y 120 rpm y se indujo mediante IPTG 0,1 mM a OD_{600} 0,6 - 0,8 durante una noche (18 h). Para cosechar las células, los cultivos se centrifugaron a 4.000 x g durante 10 min a 4 °C. Los sedimentos se resuspendieron en 25 ml de tampón de fosfato de potasio 20 mM, pH 8,0. Las células se sometieron a sonicación en un vaso de precipitados de pulpa enfriado con hielo-agua durante 5 min con un ciclo de trabajo del 80% y el nivel de control de salida 8 usando un Branson Sonfier® 250 (Branson, Danbury, Estados Unidos). Después de la centrifugación a 75.600 xg y 10 °C durante 1 h, el sobrenadante que contenía proteínas solubles se filtró de forma estéril (filtros de 0,2 µm) y se almacenó a 4 °C. Estos lisados aclarados se utilizaron para la determinación de la actividad usando el ensayo de acetato de para-nitrofenilo (p-NPA) (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemania).

Electroforesis en gel nativo

La electroforesis en gel nativo azul (BN-PAGE) de lisados bacterianos que contenían APLE se realizó de acuerdo con el método descrito por Reisinger and Eichacker (2006), "Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE", Proteomics 6 Suppl 2, 6-15, con las siguientes modificaciones. Las alícuotas que contenían 200 µg de proteínas solubles se diluyeron con Tris/HCl 10 mM, pH 7,4 hasta un volumen final de 95 µl. Se añadieron cinco µl de tampón de carga a la muestra antes de aplicarlos en un gel de gradiente lineal al 8-16%. Los geles de gradiente (16 x 20 cm) se crearon con la ayuda de un modelo anterior Bio-Rad Gradient 485 (Bio-Rad Laboratories, Viena, Austria). La electroforesis se realizó a una corriente constante de 24 mA por gel a 4 °C. Después de la electroforesis, los geles se incubaron en tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,0, durante 20 min a temperatura ambiente. Para la detección en el gel de la actividad de la esterasa, el sustrato diacetato de fluoresceína (FDA) se disolvió en acetona [4 mg/ml] y se aplicó sobre una membrana Biodyne® A (0,45 mm, 16 x 20 cm) (Pall Life Science, Michigan, Estados Unidos). Después de la evaporación de la acetona, la membrana se puso en contacto con el gel que se colocó sobre una placa de vidrio. El emparedado de membrana de gel se incubó a 37 °C durante 30 minutos antes de la detección de bandas fluorescentes.

SDS-PAGE, análisis de transferencia Western y electroforesis en gel nativo.

La SDS-PAGE se basó en protocolos estándar. Antes de cargar en los geles (gel de separación: 12,5%, gel de apilamiento: 4%), las muestras que contenían 80 µg de proteínas totales se mezclaron con la cantidad respectiva de tampón de muestra 2x y se calentaron a 40 °C durante 15 min. Se usó una unidad TE 22 Mighty Small Transphor Tank Transfer Unit (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) para la transferencia de proteínas en una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL™ (Amersham Biosciences). El anticuerpo primario era un anticuerpo policlonal de conejo contra la carboxilesterasa de hígado porcino (abcam, Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo secundario era un anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina adsorbida contra proteínas séricas humanas (Leinco Technologies, St. Louis, Estados Unidos). La detección se realizó con la detección BCIP/NBT (CALBIOCHEM/EMD, La Jolla, Estados Unidos) directamente en la membrana. El estándar de proteínas utilizado fue la escalera de proteínas con tinción previa PageRuler™ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania).

Cuantificación de la actividad de PLE.

La actividad hacia el éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico rac. y el 3-(3,4-diclorofenil)-glutarato de dimetilo se determinaron mediante autotitulación. Las mediciones se realizaron en un Mettler Toledo DL50 GraphiX (Mettler-Toledo GmbH; Giessen, Alemania), usando NaOH 0,1 M y 0,01 M, respectivamente, como agente de valoración (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Alemania). La mezcla de reacción total de 50 ml consistió en 5 ml de sustrato, es decir, éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico racémico o 3-(3,4-diclorofenil)-glutarato de dimetilo [100 mg/ml] disueltos en tolueno, 5 ml de Tergitol® NP-9 al 10% (Sigma-Aldrich, Viena, Austria) y de 10 a 40 mg de proteínas solubles. Los volúmenes se adaptaron a 50 ml con tampón fosfato de potasio 20 mM, pH 8,0.

Se utiliza el siguiente ensayo de p-NPA:
Los ensayos de acetato de para-nitronofenilo (p-NPA) (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemania) se realizaron con lisados aclarados a temperatura ambiente en tampón Tris/HCl 100 mM, pH 7,0, utilizando p-NPA 2 mM. La liberación de para-nitrofenol se cuantificó a 405 nm (ε = 9,5946 ml µmol-1 cm-1) utilizando un espectrofotómetro BeckmanCoulterDU® 800 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Alemania). Una unidad se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de para-nitrofenol en un minuto en las condiciones de reacción anteriores.

Ejemplos

La invención se aclarará con referencia a los siguientes ejemplos, sin embargo, no estará restringida por estos:

Ejemplo 1: Cuantificación de la actividad de PLE.

El ensayo de p-NPA como se ha descrito anteriormente, se usó como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de para-nitrofenol en un minuto en las condiciones de reacción anteriores.

La Figura 2 muestra el aumento en la actividad celular total hacia p-NPA de las PLE mutantes V263D expresadas en E. coli en comparación con las enzimas de tipo salvaje de PLE sin la mutación V263D expresada en E. coli. Como el nivel del 100% para cada PLE se toma el nivel de la variante de tipo salvaje de PLE respectiva.

En el marco de esta invención, todos los polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 y homólogos de las mismas se denominan PLE. Por lo tanto, también la enzima llamada carboxilesterasa intestinal porcina (PICE) es una PLE en el marco de esta invención.

Resulta evidente que todas las PLE tras insertar la mutación V263D mostraron una actividad mejorada.

Ejemplo 2

El cambio en la estructura cuaternaria de multímero a monómero en iso-enzimas con mutaciones V263D se observó además en la electroforesis en gel de proteína nativa (Figura 3).

La actividad de la esterasa se visualizó en el presente documento a través de la tinción con fluoresceína resultante de la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA). Las 7 enzimas de tipo salvaje son trímeros de aproximadamente la misma altura en el gel nativo, mientras que los mutantes V263D muestran bandas en el tercio inferior del gel. Se extirparon múltiples bandas y se analizaron en un gel SDS-PAGE. Las bandas múltiples dan como resultado una banda clara del tamaño de aproximadamente 58 kDa (datos no mostrados). Se supone que estas bandas son resultado de diferentes conformaciones del mismo monómero.

Ejemplo 3: Determinación de la estructura cuaternaria

Centrifugación en gradiente de densidad de glicerol.

Las fracciones de 1 ml que variaban del 50% al 5% de glicerol en tampón fosfato de potasio 20 mM, pH 8,0, se estratificaron cuidadosamente una encima de otra en tubos de centrífuga Ultra-Clear™ (14 x 89 mm) (Beckman, Palo Alto, Estados Unidos). Posteriormente, se estratificaron cuidadosamente 500 µl de lisado que contenía proteínas solubles en el mismo tampón en la parte superior. Se realizó una centrifugación de alta velocidad a aprox. 200.000 x g en un rotor SW 41 (Beckman, Palo Alto, Estados Unidos) durante 20 h a 4 °C. Las fracciones, es decir, 500 µl de glicerol al 0% y 1 ml de glicerol al 5 - 50%, se recogieron cuidadosamente en tubos de reacción de 1,5 ml y se almacenaron a 4 ºC.

Ensayo de filtro:

Se empaparon círculos de filtro estándar cualitativo de Whatman - grado de estudiante/grado 93 Ø 85 mm (Whatman International Ltd., Maidstone, Inglaterra) en una mezcla de ensayo que contenía 2 mg/ml de rojo de fenol, pH 7,5, Tergitol® NP-9 al 1% (v/v) (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemania) y éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico racémico al 10% (v/v) (DSM Fine Chemicals Austria GmbH, Linz, Austria) (para las figuras complementarias 5-10, el sustrato fue metilsuccinato de dimetilo racémico al 10% (v/v)). Si el valor de pH de la mezcla de ensayo era demasiado bajo, se añadieron volúmenes crecientes de tampón fosfato de potasio 1 M, pH 8,0. Se mancharon 2 µl de extractos libres de células en los filtros. El cambio de color de rojo a amarillo, causado por la hidrólisis de los ésteres y la liberación de los respectivos ácidos carboxílicos, indica la actividad enzimática. La calidad del sustrato, la cantidad de tampón adicional y el pH de partida determinaron el tiempo necesario para un cambio de color.

El resultado muestra que la fracción principal del APLE de tipo salvaje localiza entre el 25% y el 30% de la concentración de glicerol, mientras que la fracción principal del mutante, el APLE monomérico, localiza entre el 15 y el 20% de glicerol, véase la Figura 4.

Se realizaron experimentos similares para todas las variantes de PLE de origen natural, y todos mostraron el mismo efecto. (Véanse las figuras complementarias 5-10). El estándar de proteínas utilizado en todos los experimentos complementarios fue la escalera de proteínas teñida previamente PageRuler™.

Ejemplo 4

La actividad hacia acetato de para-nitrofenilo (gris claro) y 3-(3,4-diclorofenil)-glutarato de dimetilo (gris), y la actividad hacia acetato de para-nitrofenilo (gris claro) y éster metílico del ácido (4E)-5-cloro-2-isopropilpent-4-enoico rac (gris oscuro) se midió como se ha descrito anteriormente en la sección "Materiales y métodos", "Cuantificación de la actividad de PLE". Los resultados se muestran en la figura 11a y 11b.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS:

Figura 3:

1a. APLE
1b: APLE con mutación V263D
2a: PLE3
2b: PLE3 con mutación V263D
3a:PLE4
3b: PLE4 con mutación V263D
4a: PLE5
4b: PLE5 con mutación V263D
Neg.C: origami B de E. coli de control negativo
5a: γ-PLE
5b: γ-PLE con mutación V263D
6a: PLE2
6b: PLE2 con mutación V263D
7a: PICE
7b: PICE con mutación V263D

Figura 4:

a, b: APLE tipo salvaje
c, d: APLE-V263D
a, c: Ensayos de cambio de pH
b, d: Transferencia Western

Figura 5:

a, b: γPLE de tipo salvaje
c, d: γPLE-V263D
a, c: Ensayos de cambio de pH
b, d: Transferencia Western

Figura 6:

a, b: PICE de tipo salvaje
c, d: PICE-V263D
a, c: Ensayos de cambio de pH
b, d: Transferencia Western

Figura 7:

a, b: PLE2 de tipo salvaje
c, d: PLE2-V263D
a, c: Ensayos de cambio de pH
b, d: Transferencia Western

Figura 8:

a, b: PLE3 de tipo salvaje
c, d: PLE3-V263D
a, c: Ensayos de cambio de pH
b, d: Transferencia Western

Figura 9:

a, b PLE4 de tipo salvaje
c, d PLE4-V263D

a, c Ensayos de cambio de pH
b, d Transferencia Western

Figura 10:

a, b PLE5 de tipo salvaje
c, d PLE5-V263D
a, c Ensayos de cambio de pH
b, d Transferencia Western

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V. DSM Fine Chemicals Austria Nfg GmbH & Co KG

<120> Esterasas de hígado de cerdo mejoradas

<130> 27193-WO-PCT

<150> EP09158759.2
<151> 14-04-2009

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 6407
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Plásmido

<220>
<221> exón
<222> (4754)..(6397)
<223> APLE [Esterasa de hígado de cerdo alternativa]

<220>
<221> CDS
<222> (4754)..(6397)

<400> 1

```
ggctgttttg gcggatgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc agaacgcaga      60
agcggtctga taaaacagaa tttgcctggc ggcagtagcg cggtggtccc acctgacccc     120
atgccgaact cagaagtgaa acgccgtagc gccgatggta gtgtggggtc tccccatgcg     180
agagtaggga actgccaggc atcaaataaa acgaaaggct cagtcgaaag actgggcctt     240
tcgttttatc tgttgtttgt cggtgaacgc tctcctgagt aggacaaatc cgccgggagc     300
ggatttgaac gttgcgaagc aacggcccgg agggtggcgg gcaggacgcc cgccataaac     360
tgccaggcat caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggccttttg cgtttctaca      420
aactcttttt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gacgaataaa     480
tacctgtgac ggaagatcac ttcgcagaat aaataaatcc tggtgtccct gttgataccg     540
ggaagccctg ggccaacttt tggcgaaaat gagacgttga tcggcacgta agaggttcca     600
actttcacca taatgaaata agatcactac cgggcgtatt ttttgagtta tcgagatttt     660
caggagctaa ggaagctaaa atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat     720
cccaatggca tcgtaaagaa cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata     780
accagaccgt tcagctggat attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca     840
agttttatcc ggcctttatt cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc     900
```

gtatggcaat gaaagacggt gagctggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg 960

ttttccatga gcaaactgaa acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc 1020

ggcagtttct acacatatat tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt 1080

tccctaaagg gtttattgag aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca 1140

ccagttttga tttaaacgtg gccaatatgg acaacttctt cgcccccgtt ttcaccatgg 1200

gcaaatatta tacgcaaggc gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg 1260

ccgtttgtga tggcttccat gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcgatg 1320

agtggcaggg cggggcgtaa ttttttaaag gcagttattg gtgcccttaa acgcctggtg 1380

ctacgcctga ataagtgata ataagcggat gaatggcaga aattcgaaag caaattcgac 1440

ccggtcgtcg gttcagggca gggtcgttaa atagccgctt atgtctattg ctggtttacc 1500

ggtttattga ctaccggaag cagtgtgacc gtgtgcttct caaatgcctg aggccagtta 1560

gatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 1620

gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 1680

acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 1740

tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag 1800

ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 1860

atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 1920

agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag 1980

cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gcattgagaa 2040

agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga 2100

acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 2160

gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc 2220

ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 2280

gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 2340

gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag 2400

gaagcggaag agcgcctgat gcggtatttt ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac 2460

cgcacgaacg ccagcaagac gtagcccagc gcgtcggcca gcttgcaatt cgcgctaact 2520

tacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 2580

gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gccagggtgg 2640

tttttctttt caccagtgag acgggcaaca gctgattgcc cttcaccgcc tggccctgag 2700

agagttgcag caagcggtcc acgctggttt gccccagcag gcgaaaatcc tgtttgctgg 2760

tggttaacgg cgggatataa catgagctgt cttcggtatc gtcgtatccc actaccgaga 2820

tatccgcacc aacgcgcagc ccggactcgg taatggcgcg cattgcgccc agcgccatct 2880

```
gatcgttggc aaccagcatc gcagtgggaa cgatgccctc attcagcatt tgcatggttt     2940

gttgaaaacc ggacatggca ctccagtcgc cttcccgttc cgctatcggc tgaatttgat     3000

tgcgagtgag atatttatgc cagccagcca gacgcagacg cgccgagaca gaacttaatg     3060

ggcccgctaa cagcgcgatt tgctggtgac ccaatgcgac cagatgctcc acgcccagtc     3120

gcgtaccgtc ttcatgggag aaaataatac tgttgatggg tgtctggtca gagacatcaa     3180

gaaataacgc cggaacatta gtgcaggcag cttccacagc aatggcatcc tggtcatcca     3240

gcggatagtt aatgatcagc ccactgacgc gttgcgcgag aagattgtgc accgccgctt     3300

tacaggcttc gacgccgctt cgttctacca tcgacaccac cacgctggca cccagttgat     3360

cggcgcgaga tttaatcgcc gcgacaattt gcgacggcgc gtgcagggcc agactggagg     3420

tggcaacgcc aatcagcaac gactgtttgc ccgccagttg ttgtgccacg cggttgggaa     3480

tgtaattcag ctccgccatc gccgcttcca ctttttcccg cgttttcgca gaaacgtggc     3540

tggcctggtt caccacgcgg gaaacggtct gataagagac accggcatac tctgcgacat     3600

cgtataacgt tactggtttc acattcacca ccctgaattg actctcttcc gggcgctatc     3660

atgccatacc gcgaaaggtt ttgcaccatt cgatggtgtc aacgtaaatg ccgcttcgcc     3720

ttcgcgcgcg aattgcaagc tgatccgggc ttatcgactg cacggtgcac caatgcttct     3780

ggcgtcaggc agccatcgga agctgtggta tggctgtgca ggtcgtaaat cactgcataa     3840

ttcgtgtcgc tcaaggcgca ctcccgttct ggataatgtt ttttgcgccg acatcataac     3900

ggttctggca aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcggctc gtataatgtg     3960

tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacaga attcgagctc ggtacccggg     4020

gatcctttaa ctttaagaag gagatataat ggatgacgcg gcaattcaac aaacgttagc     4080

caaaatgggc atcaaaagca gcgatattca gcccgcgcct gtagctggca tgaagacagt     4140

tctgactaac agcggcgtgt tgtacatcac cgatgatggt aaacatatca ttcaggggcc     4200

aatgtatgac gttagtggca cggctccggt caatgtcacc aataagatgc tgttaaagca     4260

gttgaatgcg cttgaaaaag agatgatcgt ttataaagcg ccgcaggaaa aacacgtcat     4320

caccgtgttt actgatatta cctgtggtta ctgccacaaa ctgcatgagc aaatggcaga     4380

ctacaacgcg ctggggatca ccgtgcgtta tcttgctttc ccgcgccagg ggctggacag     4440

cgatgcagag aaagaaatga aagctatctg gtgtgcgaaa gataaaaaca aagcgtttga     4500

tgatgtgatg gcaggtaaaa gcgtcgcacc agccagttgc gacgtggata ttgccgacca     4560

ttacgcactt ggcgtccagc ttggcgttag cggtactccg gcagttgtgc tgagcaatgg     4620

cacacttgtt ccgggttacc agccgccgaa agagatgaaa gaattcctcg acgaacacca     4680

aaaaatgacc agcggtaaat aaggatcctc tagaaataat tttgtttaac tttaagaagg     4740

agatatacat atg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct         4789
                Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala
```

```
                1               5                  10

caa gga cga gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa       4837
Gln Gly Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln
        15                  20                  25

ccg gtt gct gtc ttc ttg gga gtc cct ttt gct aag cca cct ctt gga       4885
Pro Val Ala Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly
    30                  35                  40

tct ttg agg ttt gcc ccg ccg caa cca gca gag cca tgg tct ttc gtt       4933
Ser Leu Arg Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val
45                  50                  55                  60

aag aac act act tcc tac cct cca atg tgt tgt caa gaa cca atc gga       4981
Lys Asn Thr Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly
                65                  70                  75

gga caa atg ctt tca gac cta ttc act aac aga aag gaa agg ctt atc       5029
Gly Gln Met Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile
            80                  85                  90

ccg gag ttc tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc       5077
Pro Glu Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala
        95                  100                 105

gat ttg aca aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga       5125
Asp Leu Thr Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly
    110                 115                 120

gga ggt ttg gtt gtt ggc gga gca tcc act tat gac gga ttg gct ctt       5173
Gly Gly Leu Val Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu
125                 130                 135                 140

gcc gcg cac gag aac gtt gtt gtt gtt gct att caa tac cgt ttg ggt       5221
Ala Ala His Glu Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly
                145                 150                 155

att tgg gga ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg       5269
Ile Trp Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp
            160                 165                 170

ggc cat tta gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att       5317
Gly His Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile
        175                 180                 185

gct aac ttc gga ggt gat cca ggt tct gtt act att ttc gga gaa tca       5365
Ala Asn Phe Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser
    190                 195                 200

gca ggc gga gag agt gtc tct gta ttg gtt tta tca cca tta gct aag       5413
Ala Gly Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys
205                 210                 215                 220

aac ctt ttt cat cgt gct att tcc gaa agt ggt gtt gct ttt acc gcc       5461
Asn Leu Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr Ala
                225                 230                 235

ggt ttg gtc agg aag gat atg aag gcc gca gcc aag cag atc gct gtc       5509
Gly Leu Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val
            240                 245                 250

ctt gca gga tgc aaa act act act tcg gca gtc ttc gtg cat tgt ttg       5557
Leu Ala Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu
        255                 260                 265
```

```
cgt caa aag tcg gaa gat gaa ctt tta gac ctc acg ttg aag atg aaa       5605
Arg Gln Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys
    270                 275                 280

ttc ttt gcc ctt gac tta cac gga gat cca agg gaa tct cac cct ttt       5653
Phe Phe Ala Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe
285                 290                 295                 300

ttg acc act gtt gtt gac gga gtt ttg ttg cct aag atg cct gag gaa       5701
Leu Thr Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu
                305                 310                 315

atc ttg gcc gag aag gac ttt aac acc gtc cca tac att gtt gga att       5749
Ile Leu Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile
            320                 325                 330

aac aag cag gag ttc gga tgg ctt ttg cca acg atg atg gga ttt cct       5797
Asn Lys Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro
        335                 340                 345

ctt tcc gag gga aag ttg gat caa aag acg gct acg tca ctt ttg tgg       5845
Leu Ser Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp
    350                 355                 360

aag tcc tac cca att gcc aac att cct gaa gag ttg acc cca gtt gct       5893
Lys Ser Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala
365                 370                 375                 380

acc gat aag tat tta gga gga aca gat gat cct gtc aaa aag aaa gat       5941
Thr Asp Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp
                385                 390                 395

ttg ttt ttg gat ctg atg gga gac gtt gtt ttc ggc gtc cca tca gtt       5989
Leu Phe Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val
            400                 405                 410

acg gtt gct cgt cag cat agg gac gca gga gct cca act tac atg tat       6037
Thr Val Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr
        415                 420                 425

gag ttc caa tat cgt cca tct ttt tca tcg gat aag aaa cct aag acg       6085
Glu Phe Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr
    430                 435                 440

gtt att gga gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca       6133
Val Ile Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro
445                 450                 455                 460

ttg ctc aaa ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg       6181
Leu Leu Lys Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr
                465                 470                 475

gtt atg aaa ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga       6229
Val Met Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly
            480                 485                 490

gaa gga ttg cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt       6277
Glu Gly Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu
        495                 500                 505

caa att ggt gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag       6325
Gln Ile Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu
    510                 515                 520
```

```
gtt gct ttt tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca       6373
Val Ala Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro
525                 530                 535                 540

cct aag ata aag cac gcc gaa ttg taataagctt                           6407
Pro Lys Ile Lys His Ala Glu Leu
                545
```

<210> 2
<211> 548
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 2

```
Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg Val
1               5                   10                  15

Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala Val
            20                  25                  30

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

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

Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met Leu
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly Phe
145                 150                 155                 160

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

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

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

Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe His
    210                 215                 220

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

Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly Cys
                245                 250                 255

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

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

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

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

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

Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu Gly
            340                 345                 350

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

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

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

Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala Arg
                405                 410                 415

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

Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly Asp
        435                 440                 445
```

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

Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys Phe
465                 470                 475                 480

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

His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Val
            500                 505                 510

Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe Trp
        515                 520                 525

Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile Lys
    530                 535                 540

His Ala Glu Leu
545
```

<210> 3
<211> 1660
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Gen sintético

<220>
<221> exón
<222> (7)..(1650)
<223> gamma PLE

<220>
<221> CDS
<222> (7)..(1650)
<223> gamma PLE

<400> 3

```
catatg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga          48
       Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly
       1               5                   10

cga gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt         96
Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val
15                  20                  25                  30

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

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

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

atg acg tca gac cta ttc act aac gga aag gaa agg ctt acc ctg gag        288
Met Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu Thr Leu Glu
    80                  85                  90

ttc tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg        336
Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu
95                  100                 105                 110

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

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

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

gga ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat        528
Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His
    160                 165                 170

tta gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac        576
Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn
175                 180                 185                 190

ttc gga ggt gat cca ggt tct gtt act att ttc gga gaa tca gca ggc        624
Phe Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly
                195                 200                 205

gga gag agt gtc tct gta ttg gtt tta tca cca tta gct aag aac ctt        672
Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu
            210                 215                 220

ttt cat cgt gct att tcc gaa agt ggt gtt gct tta acc gtc gct ttg        720
Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Leu Thr Val Ala Leu
        225                 230                 235

gtc agg aag gat atg aag gcc gca gcc aag cag atc gct gtc ctt gca        768
Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala
    240                 245                 250

gga tgc aaa act act act tcg gca gtc ttc gtg cat tgt ttg cgt caa        816
Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln
255                 260                 265                 270

aag tcg gaa gat gaa ctt tta gac ctc acg ttg aag atg aaa ttc ctg        864
Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Leu
                275                 280                 285

acc ctt gac ttt cac gga gat caa agg gaa tct cac cct ttt ttg ccg        912
Thr Leu Asp Phe His Gly Asp Gln Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Pro
            290                 295                 300

act gtt gtt gac gga gtt ttg ttg cct aag atg cct gag gaa atc ttg        960
Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu
        305                 310                 315

gcc gag aag gac ttt aac acc gtc cca tac att gtt gga att aac aag       1008
```

```
Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys
    320                 325                 330

cag gag ttc gga tgg ctt ttg cca acg atg atg gga ttt cct ctt tcc       1056
Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser
335                 340                 345                 350

gag gga aag ttg gat caa aag acg gct acg tca ctt ttg tgg aag tcc       1104
Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser
                355                 360                 365

tac cca att gcc aac att cct gaa gag ttg acc cca gtt gct acc gat       1152
Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp
            370                 375                 380

aag tat tta gga gga aca gat gat cct gtc aaa aag aaa gat ttg ttt       1200
Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe
        385                 390                 395

ttg gat ctg atg gga gac gtt gtt ttc ggc gtc cca tca gtt acg gtt       1248
Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val
    400                 405                 410

gct cgt cag cat agg gac gca gga gct cca act tac atg tat gag ttc       1296
Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe
415                 420                 425                 430

caa tat cgt cca tct ttt tca tcg gat aag aaa cct aag acg gtt att       1344
Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile
                435                 440                 445

gga gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca ttg ctc       1392
Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu
            450                 455                 460

aaa ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg       1440
Lys Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met
        465                 470                 475

aaa ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga       1488
Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly
    480                 485                 490

ttg cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att       1536
Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile
495                 500                 505                 510

ggt gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct       1584
Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala
                515                 520                 525

ttt tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag       1632
Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys
            530                 535                 540

ata aag cac gcc gaa ttg taataagctt                                   1660
Ile Lys His Ala Glu Leu
        545
```

<210> 4
<211> 548
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 4

```
Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg Val
1               5                  10                  15

Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala Val
            20                  25                  30

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

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

Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val Val Glu Gln Met Thr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Leu Gly Gly Ala Pro Met Tyr Asp Gly Val Val Leu Ala Ala His Glu
    130                 135                 140

Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly Phe
145                 150                 155                 160

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

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

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

Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe His
    210                 215                 220

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

```
Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly Cys
                245                 250                 255

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

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

Asp Phe His Gly Asp Gln Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Pro Thr Val
    290                 295                 300

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

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

Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu Gly
            340                 345                 350

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

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

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

Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala Arg
                405                 410                 415

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

Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly Asp
        435                 440                 445

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

Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys Phe
465                 470                 475                 480

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

His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Val
```

```
            500                 505                 510

Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe Trp
        515                 520                 525

Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile Lys
    530                 535                 540

His Ala Glu Leu
545
```

<210> 5
<211> 1660
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Gen sintético

<220>
<221> exón
<222> (7)..(1650)
<223> Esterasa de colon intestinal porcina

<220>
<221> CDS
<222> (7)..(1650)
<223> Esterasa de colon intestinal porcina

<400> 5

```
catatg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga          48
       Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly
       1               5                   10

cga gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt         96
Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val
15                  20                  25                  30

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

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

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

atg acg tca gac cta ttc act aac gga aag gaa agg ctt atc ccg gag        288
Met Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu
    80                  85                  90

ttc tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg        336
Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu
95                  100                 105                 110

aca aag agg ggt agg ttg ccg gtt atg gtt tgg att cat gga gga ggt        384
Thr Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly
```

```
                115                 120                 125

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

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

gga ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat        528
Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His
    160                 165                 170

tta gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac        576
Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn
175                 180                 185                 190

ttc gga ggt gat aca ggt tct gtt act att ttc gga gaa tca gca ggc        624
Phe Gly Gly Asp Thr Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly
                195                 200                 205

gga gag agt gtc tct gta ttg gtt tta tca cca tta gct aag aac ctt        672
Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu
            210                 215                 220

ttt cat cgt gct att tcc gaa agt ggt gtt gct tta acc gcc ggt ttg        720
Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Leu Thr Ala Gly Leu
        225                 230                 235

gtc agg aag gat atg aag gcc gca gcc aag cag atc gct gtc ctt gca        768
Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala
    240                 245                 250

gga tgc aaa act act act tcg gca gtc ttc gtg cat tgt ttg cgt caa        816
Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln
255                 260                 265                 270

aag tcg gaa gat gaa ctt tta gac ctc acg ttg aag atg aaa ttc ctg        864
Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Leu
                275                 280                 285

acc ctt gac tta cac gga gat cca agg gaa tct cac cct ttt ttg ccg        912
Thr Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Pro
            290                 295                 300

act gtt gtt gac gga gtt ttg ttg cct aag atg cct gag gaa atc ttg        960
Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu
        305                 310                 315

gcc gag aag gac ttt aac acc gtc cca tac att gtt gga att aac aag       1008
Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys
    320                 325                 330

cag gag ttc gga tgg ctt ttg cca acg atg atg gga ttt cct ctt tcc       1056
Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser
335                 340                 345                 350

gag gga aag ttg gat caa aag acg gct acg tca ctt ttg tgg aag tcc       1104
Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser
                355                 360                 365

ttc cca att acc aac att cct gaa gag ttg acc cca gtt gct acc gat       1152
Phe Pro Ile Thr Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp
            370                 375                 380
```

```
aag tat tta gga gga aca gat gat cct gtc aaa aag aaa gat ttg ttt       1200
Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe
        385                 390                 395

ttg gat ctg atg gga gac gtt gtt ttc ggc gtc cca tca gtt acg gtt       1248
Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val
    400                 405                 410

gct cgt cag cat agg gac gca gga gct cca act tac atg tat gag ttc       1296
Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe
415                 420                 425                 430

caa tat cgt cca tct ttt tca tcg gat aag aaa cct aag acg gtt att       1344
Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile
                435                 440                 445

gga gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca ttg ctc       1392
Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu
            450                 455                 460

aaa ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg       1440
Lys Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met
        465                 470                 475

aaa ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga       1488
Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly
    480                 485                 490

ttg cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att       1536
Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile
495                 500                 505                 510

ggt gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct       1584
Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala
                515                 520                 525

ttt tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag       1632
Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys
            530                 535                 540

ata aag cac gcc gaa ttg taataagctt                                   1660
Ile Lys His Ala Glu Leu
        545
```

<210> 6
<211> 548
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 6

```
Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg Val
1               5                   10                  15

Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala Val
            20                  25                  30

Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg Phe
```

```
        35                  40                  45

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

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

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

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

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

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

Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly Phe
145                 150                 155                 160

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

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

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

Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe His
    210                 215                 220

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

Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly Cys
                245                 250                 255

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

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

Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Pro Thr Val
    290                 295                 300
```

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

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

Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu Gly
            340                 345                 350

Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Phe Pro
        355                 360                 365

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

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

Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala Arg
                405                 410                 415

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

Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly Asp
        435                 440                 445

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

Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys Phe
465                 470                 475                 480

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

His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Val
            500                 505                 510

Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe Trp
        515                 520                 525

Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile Lys
    530                 535                 540

His Ala Glu Leu
545
```

<210> 7
<211> 1660
<212> ADN

<213> Desconocido

<220>
<223> Gen sintético

<220>
<221> exón
<222> (7)..(1650)
<223> Esterasa 2 de hígado de cerdo

<220>
<221> CDS
<222> (7)..(1650)
<223> Esterasa 2 de hígado de cerdo

<400> 7

```
catatg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga          48
       Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly
       1               5                   10

cga gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt          96
Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val
15                  20                  25                  30

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

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

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

atg acg tca gac cta ttc act aac gga aag gaa agg ctt acc ctg gag         288
Met Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu Thr Leu Glu
    80                  85                  90

ttc tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg         336
Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu
95                  100                 105                 110

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

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

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

gga ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat         528
Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His
    160                 165                 170
```

```
tta gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac        576
Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn
175                 180                 185                 190

ttc gga ggt gat cca ggt tct gtt act att ttc gga gaa tca gca ggc        624
Phe Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly
                195                 200                 205

gga gag agt gtc tct gta ttg gtt tta tca cca tta gct aag aac ctt        672
Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu
            210                 215                 220

ttt cat cgt gct att tcc gaa agt ggt gtt gct tta acc gtc gct ttg        720
Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Leu Thr Val Ala Leu
        225                 230                 235

gtc agg aag gat atg aag gcc gca gcc aag cag atc gct gtc ctt gca        768
Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala
    240                 245                 250

gga tgc aaa act act act tcg gca gtc ttc gtg cat tgt ttg cgt caa        816
Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln
255                 260                 265                 270

aag tcg gaa gat gaa ctt tta gac ctc acg ttg aag atg aaa ttc ctg        864
Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Leu
                275                 280                 285

acc ctt gac ttt cac gga gat caa agg gaa tct cac cct ttt ttg ccg        912
Thr Leu Asp Phe His Gly Asp Gln Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Pro
            290                 295                 300

act gtt gtt gac gga gtt ttg ttg cct aag atg cct gag gaa atc ttg        960
Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu
        305                 310                 315

gcc gag aag gac ttt aac acc gtc cca tac att gtt gga att aac aag       1008
Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys
    320                 325                 330

cag gag ttc gga tgg ctt ttg cca acg atg atg gga ttt cct ctt tcc       1056
Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser
335                 340                 345                 350

gag gga aag ttg gat caa aag acg gct acg tca ctt ttg tgg aag tcc       1104
Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser
                355                 360                 365

tac cca att gcc aac att cct gaa gag ttg acc cca gtt gct acc gat       1152
Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp
            370                 375                 380

aag tat tta gga gga aca gat gat cct gtc aaa aag aaa gat ttg ttt       1200
Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe
        385                 390                 395

ttg gat ctg atg gga gac gtt gtt ttc ggc gtc cca tca gtt acg gtt       1248
Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val
    400                 405                 410

gct cgt cag cat agg gac gca gga gct cca act tac atg tat gag ttc       1296
Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe
415                 420                 425                 430

caa tat cgt cca tct ttt tca tcg gat aag aaa cct aag acg gtt att       1344
```

```
Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile
                435                 440                 445

gga gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc gcc cca ttc ctc      1392
Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Ala Pro Phe Leu
            450                 455                 460

aga ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg      1440
Arg Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met
        465                 470                 475

aaa ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga      1488
Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly
    480                 485                 490

ttg cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att      1536
Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile
495                 500                 505                 510

ggt gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct      1584
Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala
                515                 520                 525

ttt tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag      1632
Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys
            530                 535                 540

ata aag cac gcc gaa ttg taataagctt                                  1660
Ile Lys His Ala Glu Leu
        545
```

<210> 8
<211> 548
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 8

```
Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg Val
1               5                   10                  15

Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala Val
            20                  25                  30

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

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

Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val Val Glu Gln Met Thr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Leu Gly Gly Ala Pro Met Tyr Asp Gly Val Val Leu Ala Ala His Glu
    130                 135                 140

Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly Phe
145                 150                 155                 160

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

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

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

Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe His
    210                 215                 220

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

Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly Cys
                245                 250                 255

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

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

Asp Phe His Gly Asp Gln Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Pro Thr Val
    290                 295                 300

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

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

Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu Gly
            340                 345                 350
```

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

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

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

Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala Arg
                405                 410                 415

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

Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly Asp
        435                 440                 445

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

Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys Phe
465                 470                 475                 480

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

His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Val
            500                 505                 510

Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe Trp
        515                 520                 525

Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile Lys
    530                 535                 540

His Ala Glu Leu
545
```

<210> 9
<211> 1660
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Gen sintético

<220>
<221> exón
<222> (7)..(1650)
<223> Esterasa 3 de hígado de cerdo

<220>
<221> CDS
<222> (7)..(1650)
<223> Esterasa 3 de hígado de cerdo

<400> 9

```
catatg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga          48
       Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly
       1               5                   10

cga gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt          96
Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val
15                  20                  25                  30

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

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

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

atg ctt tca gac cta ttc act aac aga aag gaa agg ctt atc ccg gag         288
Met Leu Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu
    80                  85                  90

ttc tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg         336
Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu
95                  100                 105                 110

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

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

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

gga ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat         528
Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His
    160                 165                 170

tta gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac         576
Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn
175                 180                 185                 190

ttc gga ggt gat cca ggt tct gtt act att ttc gga gaa tca gca ggc         624
Phe Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly
               195                 200                 205

gga gag agt gtc tct gta ttg gtt tta tca cca tta gct aag aac ctt         672
Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu
            210                 215                 220

ttt cat cgt gct att tcc gaa agt ggt gtt gct ttt acc gcc ggt ttg         720
Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr Ala Gly Leu
```

```
        225                 230                 235

gtc agg aag gat atg aag gcc gca gcc aag cag atc gct gtc ctt gca        768
Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala
    240                 245                 250

gga tgc aaa act act act tcg gca gtc ttc gtg cat tgt ttg cgt caa        816
Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln
255                 260                 265                 270

aag tcg gaa gat gaa ctt tta gac ctc acg ttg aag atg aaa ccc tta        864
Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Pro Leu
                275                 280                 285

acc ctt gac tta cac gga gat cca agg gaa tct cac cct ttt ttg acc        912
Thr Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Thr
            290                 295                 300

act gtt gtt gac gga gtt ttg ttg cct aag atg cct gag gaa atc ttg        960
Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu
        305                 310                 315

gcc gag aag gac ttt aac acc gtc cca tac att gtt gga att aac aag       1008
Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys
    320                 325                 330

cag gag ttc gga tgg ctt ttg cca acg atg atg gga ttt cct ctt tcc       1056
Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser
335                 340                 345                 350

gag gga aag ttg gat caa aag acg gct acg tca ctt ttg tgg aag tcc       1104
Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser
                355                 360                 365

tac cca att gcc aac att cct gaa gag ttg acc cca gtt gct acc gat       1152
Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp
            370                 375                 380

aag tat tta gga gga aca gat gat cct gtc aaa aag aaa gat ttg ttt       1200
Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe
        385                 390                 395

ttg gat ctg atg gga gac gtt gtt ttc ggc gtc cca tca gtt acg gtt       1248
Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val
    400                 405                 410

gct cgt cag cat agg gac gca gga gct cca act tac atg tat gag ttc       1296
Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe
415                 420                 425                 430

caa tat cgt cca tct ttt tca tcg gat aag aaa cct aag acg gtt att       1344
Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile
                435                 440                 445

gga gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc ttc cca ttg ctc       1392
Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu
            450                 455                 460

aaa ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg       1440
Lys Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met
        465                 470                 475

aaa ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga       1488
Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly
    480                 485                 490
```

```
ttg cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att       1536
Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile
495                 500                 505                 510

ggt gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct       1584
Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala
                515                 520                 525

ttt tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag       1632
Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys
            530                 535                 540

ata aag cac gcc gaa ttg taataagctt                                   1660
Ile Lys His Ala Glu Leu
        545
```

<210> 10
<211> 548
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 10

```
Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg Val
1               5                   10                  15

Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala Val
            20                  25                  30

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

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

Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met Leu
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly Phe
```

```
145                 150                 155                 160

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

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

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

Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe His
    210                 215                 220

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

Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly Cys
                245                 250                 255

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

Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Pro Leu Thr Leu
        275                 280                 285

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

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

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

Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu Gly
            340                 345                 350

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

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

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

Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala Arg
                405                 410                 415
```

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

Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly Asp
        435                 440                 445

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

Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys Phe
465                 470                 475                 480

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

His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Val
            500                 505                 510

Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe Trp
        515                 520                 525

Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile Lys
    530                 535                 540

His Ala Glu Leu
545
```

<210> 11
<211> 1660
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Gen sintético

<220>
<221> exón
<222> (7)..(1650)
<223> Esterasa 4 de hígado de cerdo

<220>
<221> CDS
<222> (7)..(1650)
<223> Esterasa 4 de hígado de cerdo

<400> 11

```
catatg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga          48
       Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly
       1               5                   10

cga gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt          96
Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val
15                  20                  25                  30
```

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

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

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

atg acg tca gac cta ttc act aac gga aag gaa agg ctt atc ccg gag        288
Met Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu
    80                  85                  90

ttc tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg        336
Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu
95                  100                 105                 110

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

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

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

gga ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat        528
Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His
    160                 165                 170

tta gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac        576
Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn
175                 180                 185                 190

ttc gga ggt gat cca ggt tct gtt act att ttc gga gaa tca gca ggc        624
Phe Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly
                195                 200                 205

gga gag agt gtc tct gta ttg gtt tta tca cca tta gct aag aac ctt        672
Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu
            210                 215                 220

ttt cat cgt gct att tcc gaa agt ggt gtt gct ttt acc gcc ggt ttg        720
Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr Ala Gly Leu
        225                 230                 235

gtc agg aag gat atg aag gcc gca gcc aag cag atc gct gtc ctt gca        768
Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala
    240                 245                 250

gga tgc aaa act act act tcg gca gtc ttc gtg cat tgt ttg cgt caa        816
Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln
255                 260                 265                 270

aag tcg gaa gat gaa ctt tta gac ctc acg ttg aag atg aaa ccc tta        864
Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Pro Leu
                275                 280                 285
```

```
acc ctt gac tta cac gga gat cca agg gaa tct cac cct ttt ttg acc        912
Thr Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Thr
            290                 295                 300

act gtt gtt gac gga gtt ttg ttg cct aag atg cct gag gaa atc ttg        960
Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu
        305                 310                 315

gcc gag aag gac ttt aac acc gtc cca tac att gtt gga att aac aag       1008
Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys
    320                 325                 330

cag gag ttc gga tgg ctt ttg cca acg atg atg gga ttt cct ctt tcc       1056
Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser
335                 340                 345                 350

gag gga aag ttg gat caa aag acg gct acg tca ctt ttg tgg aag tcc       1104
Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser
                355                 360                 365

tac cca att gcc aac att cct gaa gag ttg acc cca gtt gct acc gat       1152
Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp
            370                 375                 380

aag tat tta gga gga aca gat gat cct gtc aaa aag aaa gat ttg ttt       1200
Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe
        385                 390                 395

ttg gat ctg atg gga gac gtt gtt ttc ggc gtc cca tca gtt acg gtt       1248
Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val
    400                 405                 410

gct cgt cag cat agg gac gca gga gct cca act tac atg tat gag ttc       1296
Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe
415                 420                 425                 430

caa tat cgt cca tct ttt tca tcg gat aag aaa cct aag acg gtt att       1344
Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile
                435                 440                 445

gga gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc gcc cca ttc ctc       1392
Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Ala Pro Phe Leu
            450                 455                 460

aga ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg       1440
Arg Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met
        465                 470                 475

aaa ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga       1488
Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly
    480                 485                 490

ttg cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att       1536
Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile
495                 500                 505                 510

ggt gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct       1584
Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala
                515                 520                 525

ttt tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag       1632
Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys
            530                 535                 540

ata aag cac gcc gaa ttg taataagctt                                   1660

Ile Lys His Ala Glu Leu
        545
```

<210> 12
<211> 548
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 12

```
Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg Val
1               5                   10                  15

Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala Val
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

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

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

Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly Phe
145                 150                 155                 160

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

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

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

```
Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe His
    210                 215                 220

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

Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly Cys
                245                 250                 255

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

Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Pro Leu Thr Leu
        275                 280                 285

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

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

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

Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu Gly
            340                 345                 350

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

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

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

Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala Arg
                405                 410                 415

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

Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly Asp
        435                 440                 445

His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Ala Pro Phe Leu Arg Gly
    450                 455                 460
```

```
Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys Phe
465                 470                 475                 480

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

His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Val
            500                 505                 510

Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe Trp
        515                 520                 525

Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile Lys
    530                 535                 540

His Ala Glu Leu
545
```

<210> 13
<211> 1660
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Gen sintético

<220>
<221> exón
<222> (7)..(1650)
<223> Esterasa 5 de hígado de cerdo

<220>
<221> CDS
<222> (7)..(1650)
<223> Esterasa 5 de hígado de cerdo

<400> 13

```
catatg gga caa cca gct tcg ccg cct gtc gtt gat acc gct caa gga          48
       Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly
       1               5                   10

cga gtc ttg ggt aag tac gtc tct tta gag gga ttg gca caa ccg gtt          96
Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val
15                  20                  25                  30

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

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

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

atg acg tca gac cta ttc act aac gga aag gaa agg ctt atc ccg gag         288
```

```
Met Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Gly Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu
    80                  85                  90

ttc tct gag gat tgc ctt tac cta aat att tac act cct gcc gat ttg        336
Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu
95                  100                 105                 110

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

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

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

gga ttt ttc tcc aca gga gat gag cat tcc cgt gga aac tgg ggc cat        528
Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His
    160                 165                 170

tta gat caa gtt gct gca ttg cat tgg gtc caa gaa aac att gct aac        576
Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn
175                 180                 185                 190

ttc gga ggt gat cca ggt tct gtt act att ttc gga gaa tca gca ggc        624
Phe Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly
                195                 200                 205

gga gag agt gtc tct gta ttg gtt tta tca cca tta gct aag aac ctt        672
Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu
            210                 215                 220

ttt cat cgt gct att tcc gaa agt ggt gtt gct ttt acc gcc ggt ttg        720
Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr Ala Gly Leu
        225                 230                 235

gtc agg aag gat atg aag gcc gca gcc aag cag atc gct gtc ctt gca        768
Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala
    240                 245                 250

gga tgc aaa act act act tcg gca gtc ttc gtg cat tgt ttg cgt caa        816
Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln
255                 260                 265                 270

aag tcg gaa gat gaa ctt tta gac ctc acg ttg aag atg aaa ttc ttt        864
Lys Ser Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Phe
                275                 280                 285

gcc ctt gac tta cac gga gat cca agg gaa tct cac cct ttt ttg acc        912
Ala Leu Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Thr
            290                 295                 300

act gtt gtt gac gga gtt ttg ttg cct aag atg cct gag gaa atc ttg        960
Thr Val Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu
        305                 310                 315

gcc gag aag gac ttt aac acc gtc cca tac att gtt gga att aac aag       1008
Ala Glu Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys
    320                 325                 330

cag gag ttc gga tgg ctt ttg cca acg atg atg gga ttt cct ctt tcc       1056
Gln Glu Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser
```

```
335                 340                 345                 350

gag gga aag ttg gat caa aag acg gct acg tca ctt ttg tgg aag tcc       1104
Glu Gly Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser
                355                 360                 365

tac cca att gcc aac att cct gaa gag ttg acc cca gtt gct acc gat       1152
Tyr Pro Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp
            370                 375                 380

aag tat tta gga gga aca gat gat cct gtc aaa aag aaa gat ttg ttt       1200
Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe
        385                 390                 395

ttg gat ctg atg gga gac gtt gtt ttc ggc gtc cca tca gtt acg gtt       1248
Leu Asp Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val
    400                 405                 410

gct cgt cag cat agg gac gca gga gct cca act tac atg tat gag ttc       1296
Ala Arg Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe
415                 420                 425                 430

caa tat cgt cca tct ttt tca tcg gat aag aaa cct aag acg gtt att       1344
Gln Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile
                435                 440                 445

gga gat cat gga gac gaa att ttt tcc gtc ttc ggc gcc cca ttc ctc       1392
Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Ala Pro Phe Leu
            450                 455                 460

aga ggt gac gct cca gag gaa gaa gtc agt ctt tct aag acg gtt atg       1440
Arg Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met
        465                 470                 475

aaa ttt tgg gct aac ttc gcc cgt agt gga aac cct aat gga gaa gga       1488
Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly
    480                 485                 490

ttg cct cac tgg ccg atg tac gat caa gag gag gga tac ctt caa att       1536
Leu Pro His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile
495                 500                 505                 510

ggt gtc aac act caa gca gct aag agg ttg aaa ggc gag gag gtt gct       1584
Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala
                515                 520                 525

ttt tgg aac gac ctg ttg tcc aag gaa gca gca aag aag cca cct aag       1632
Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys
            530                 535                 540

ata aag cac gcc gaa ttg taataagctt                                   1660
Ile Lys His Ala Glu Leu
        545
```

<210> 14
<211> 548
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 14

```
Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg Val
1               5                  10                  15

Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala Val
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

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

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

Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly Phe
145                 150                 155                 160

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

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

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

Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe His
    210                 215                 220

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

Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly Cys
                245                 250                 255

Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln Lys Ser
```

```
            260                 265                 270

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

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

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

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

Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu Gly
            340                 345                 350

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

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

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

Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala Arg
                405                 410                 415

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

Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly Asp
        435                 440                 445

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

Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys Phe
465                 470                 475                 480

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

His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Val
            500                 505                 510

Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe Trp
        515                 520                 525

Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile Lys
    530                 535                 540
His Ala Glu Leu
```

545

<210> 15
<211> 41
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Cebador para L43D F

<400> 15
gtccctttg ctaagccacc tgacggatct ttgaggtttg c 41

<210> 16
<211> 41
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Cebador para L43D R

<400> 16
gcaaacctca aagatccgtc aggtggctta gcaaaaggga c 41

<210> 17
<211> 37
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Cebador para T260P F

<400> 17
gcaggatgca aaactactcc ttcggcagtc ttcgtgc 37

<210> 18
<211> 37
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Cebador para T260P R

<400> 18
gcacgaagac tgccgaagga gtagttttgc atcctgc 37

<210> 19
<211> 37
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Cebador para T260A F

<400> 19
gcaggatgca aaactactgc ttcggcagtc ttcgtgc 37

<210> 20
<211> 37

<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Cebador para T260A R

<400> 20
gcacgaagac tgccgaagca gtagttttgc atcctgc 37

<210> 21
<211> 33
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Cebador para T263D F

<400> 21
ctactacttc ggcagacttc gtgcattgtt tgc 33

<210> 22
<211> 33
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Cebador para T263D R

<400> 22
gcaaacaatg cacgaagtct gccgaagtag tag 33

<210> 23
<211> 41
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Cebador para V263G F

<400> 23
caaaactact acttcggcag ggttcgtgca ttgtttgcgt c 41

<210> 24
<211> 41
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Cebador para V263G R

<400> 24
gacgcaaaca atgcacgaac cctgccgaag tagtagtttt g 41

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que tiene actividad de esterasa que comprende una secuencia de aminoácidos con más del 90% de identidad con la secuencia mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, en el que al menos una sustitución o eliminación de aminoácido ha tenido lugar en una posición de aminoácido que se localiza en un punto de interacción de monómeros cuando los monómeros están formando multímeros, y que destruye ese punto de interacción entre los monómeros, dando como resultado una mayor cantidad de polipéptido mutante presente en la forma monomérica en comparación con el polipéptido correspondiente sin mutación, y como resultado, en un polipéptido mutante que tiene una concentración aumentada de la fracción del polipéptido mutante que está presente como una proteína activa y soluble en lisado aclarado del polipéptido mutante expresado en E. coli en relación con la concentración de la fracción del polipéptido sin que la mutación esté presente como una proteína activa y soluble en el lisado aclarado del polipéptido sin la una o más deleciones o sustituciones expresadas en E. coli en las mismas condiciones, en donde el polipéptido aislado muestra un aumento de al menos el 10% en la actividad de la esterasa en comparación con la actividad de la esterasa del polipéptido de tipo salvaje correspondiente sin deleción o sustitución de amino ácidos en donde la sustitución o eliminación se ha llevado a cabo en una o más posiciones seleccionadas del grupo de las posiciones de aminoácidos 260, 263, y posiciones correspondientes a las mismas.

2. Un polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende secuencias de aminoácidos con más del 95% de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14.

3. Un polipéptido aislado que tiene actividad esterasa, comprendiendo dicho polipéptido la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, o un homólogo de la misma que tenga una identidad de aminoácidos de más del 90 %, preferiblemente más del 95%, más preferiblemente más del 98% de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, en donde las sustituciones de aminoácidos se seleccionan del grupo de T260P, T260A, V263D, V263G y las posiciones correspondientes de los mismos.

4. Un polipéptido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende al menos una mutación adicional seleccionada del grupo de L238V y F234S.

5. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

6. Uso de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la producción de un ácido, éster o alcohol.

7. Proceso para la fabricación de ácidos, ésteres o alcoholes, en el que se aplica un polipéptido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

8. Proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que se fabrican ácidos y/o ésteres α-alquilados.

9. Proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los ácidos α-alquilados ópticamente puros se reducen a sus correspondientes alcoholes.

FIG. 1

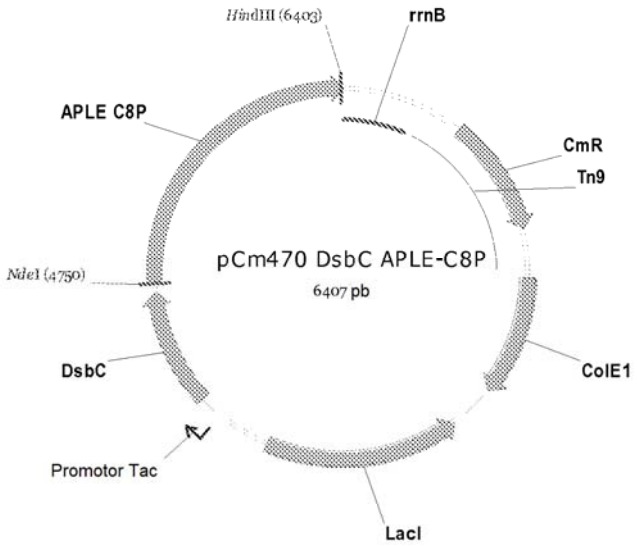
HindIII (6403)
rrnB
APLE C8P
CmR
Tn9
pCm470 DsbC APLE-C8P
6407 pb
NdeI (4750)
DsbC
ColE1
Promotor Tac
LacI

FIG. 2

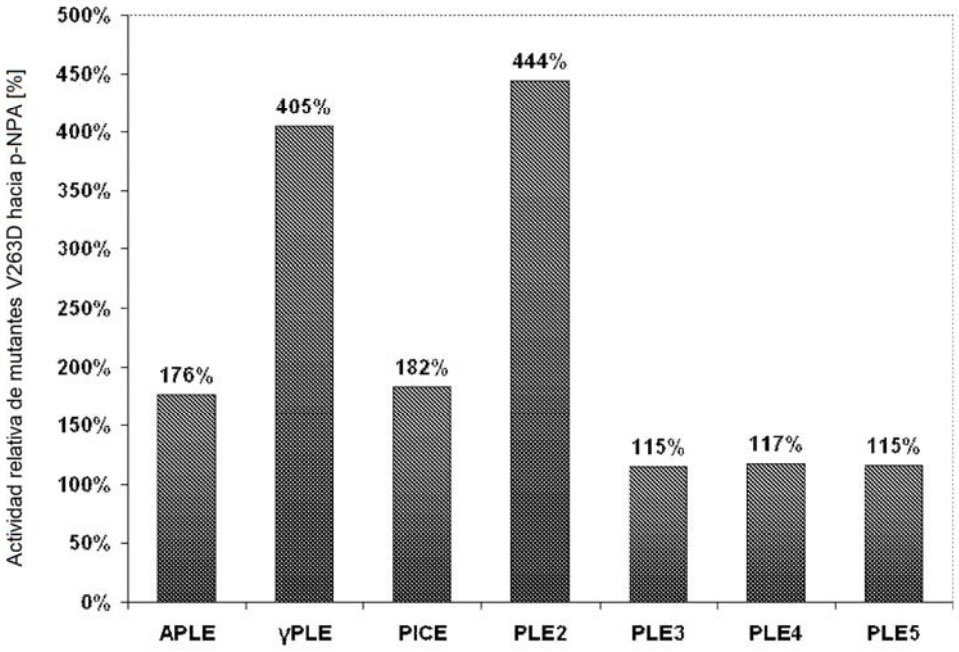
Actividad relativa de mutantes V263D hacia p-NPA [%]
500%
450%
400%
350%
300%
250%
200%
150%
100%
50%
0%
176%
405%
182%
444%
115%
117%
115%
APLE
γPLE
PICE
PLE2
PLE3
PLE4
PLE5

FIG. 3

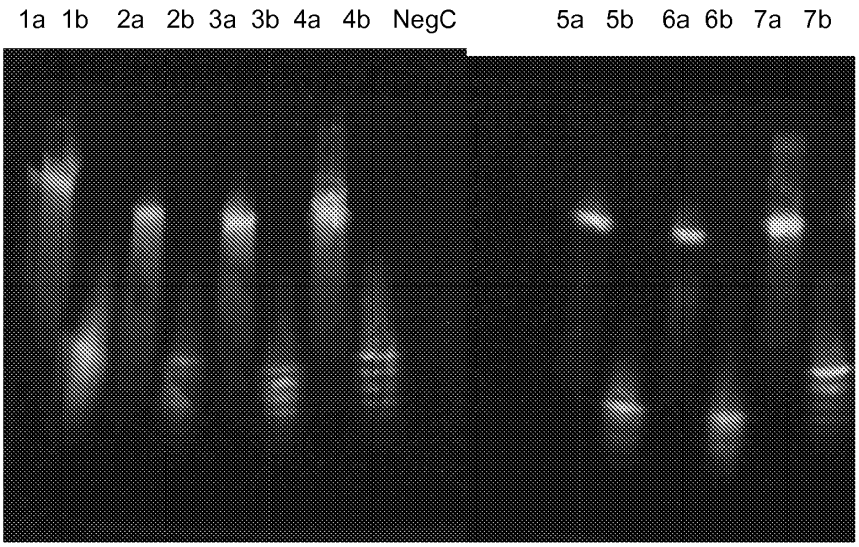
1a 1b 2a 2b 3a 3b 4a 4b NegC 5a 5b 6a 6b 7a 7b

FIG. 4

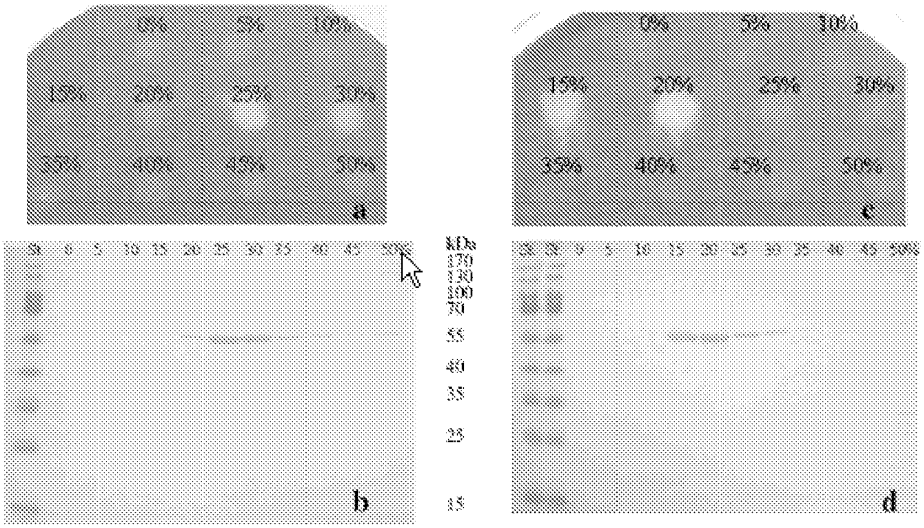
0% 5% 10%
15% 20% 25% 30%
35% 40% 45% 50%
a
b
c
d

FIG. 5

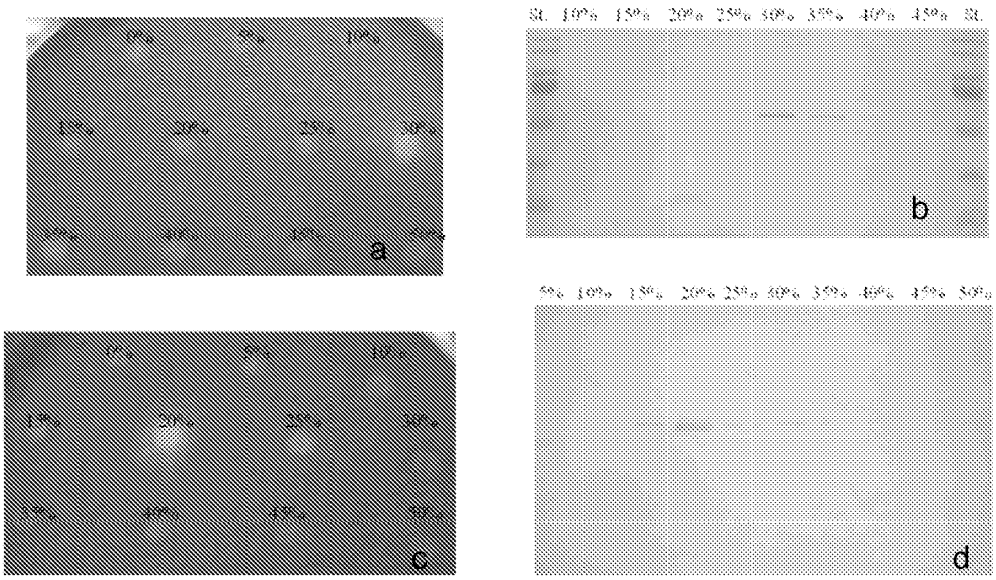

FIG. 6

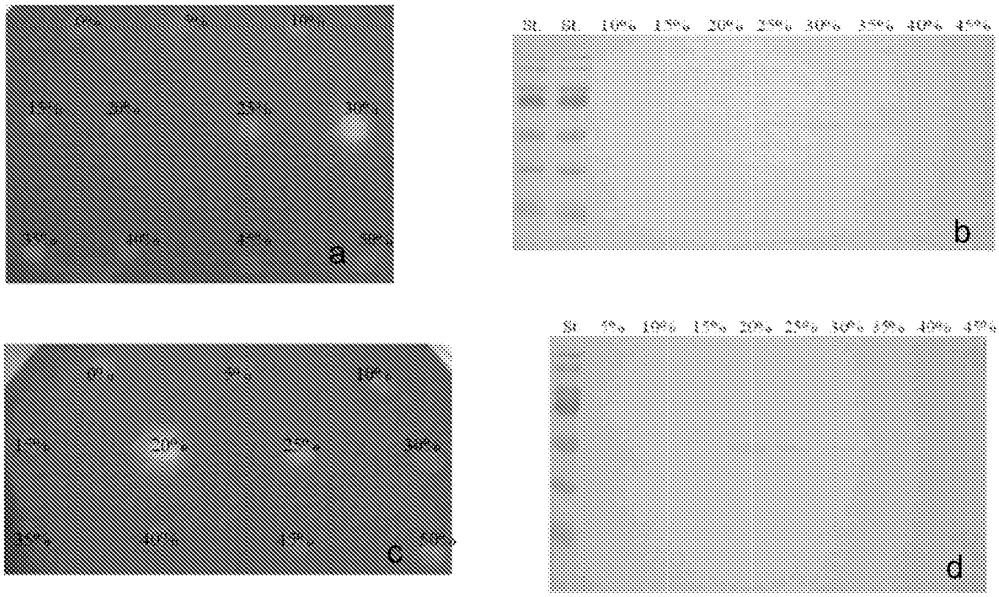

FIG. 7

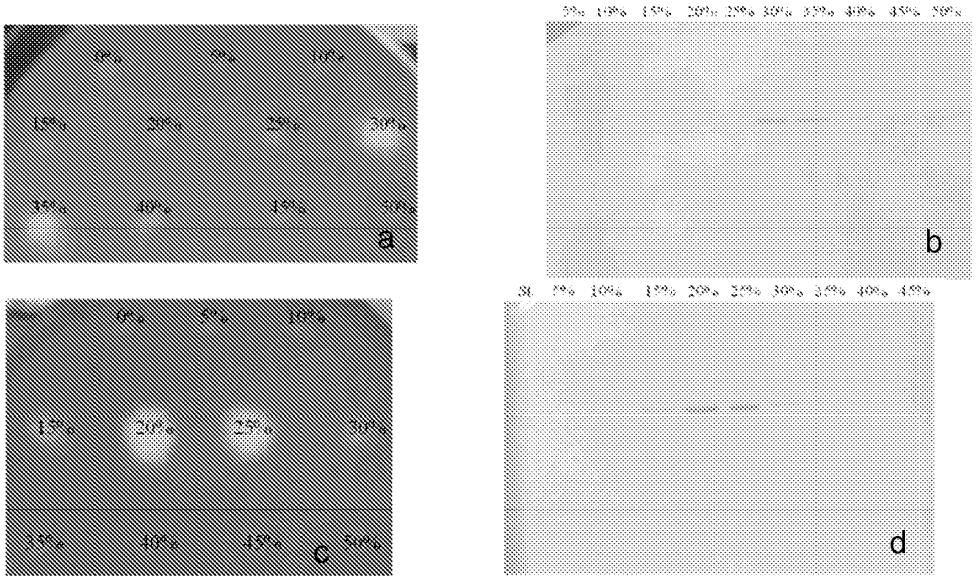

FIG. 8

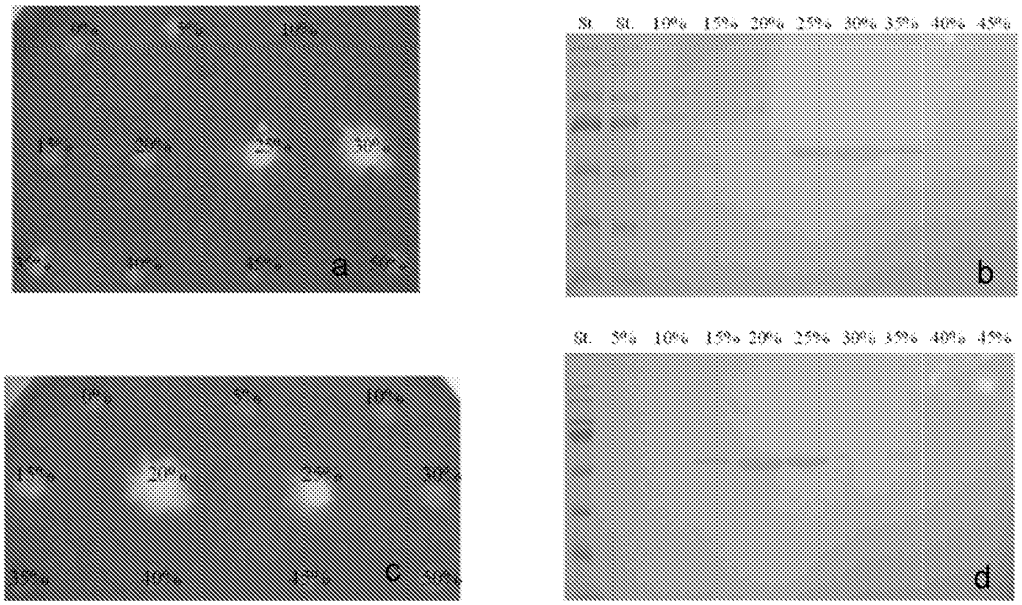

FIG. 9

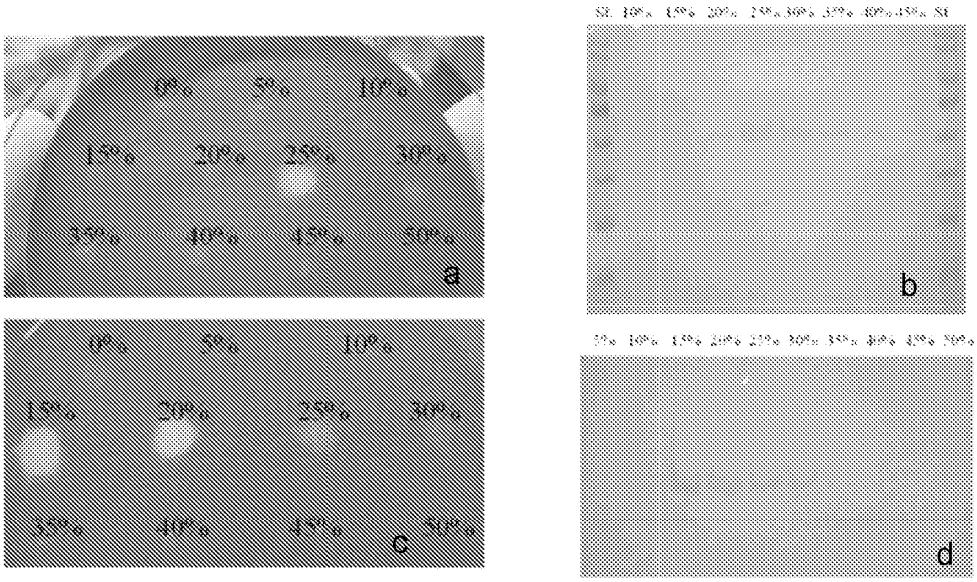

FIG. 10

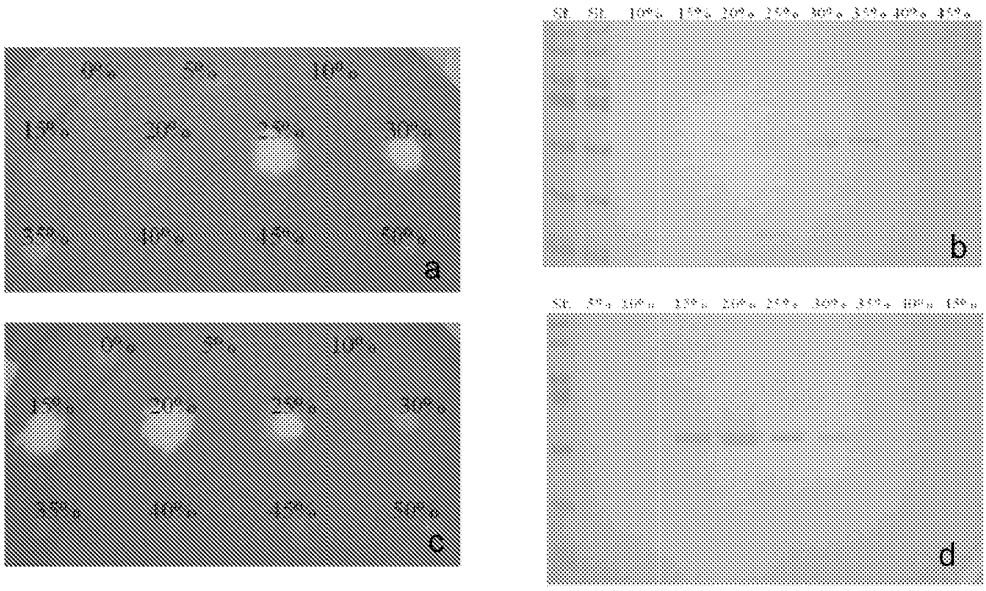

FIG. 11a

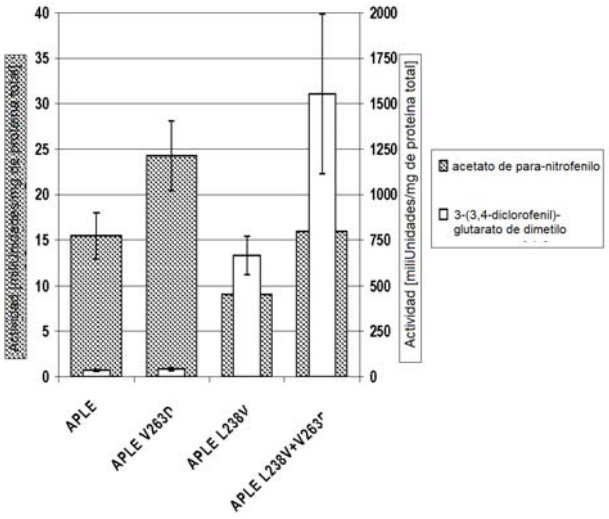
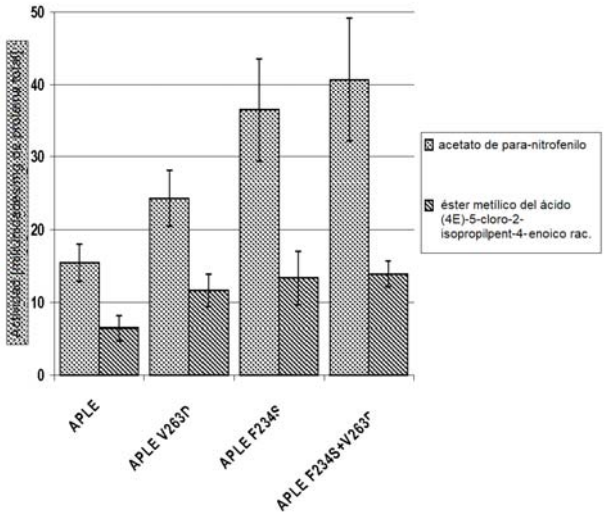
FIG. 11b