



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 652**

51 Int. Cl.:

C07H 21/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03710700 .0**

96 Fecha de presentación : **21.01.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1480993**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

54

Título: **Genes de desaturasa, enzimas codificadas por estos genes y utilización de los mismos.**

30

Prioridad: **30.01.2002 US 60793**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2009

73

Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES
CHAD 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-6050, US**

72

Inventor/es: **Mukerji, Pradip;
Pereira, Suzette, L. y
Huang, Yung-Sheng**

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 310 652 T3

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

ES 2 310 652 T3

DESCRIPCIÓN

Genes de desaturasa, enzimas codificadas por estos genes y utilización de los mismos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la identificación y el aislamiento de genes novedosos que codifican enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). La invención también está dirigida a enzimas desaturasas novedosas codificadas por estos genes y a métodos de utilización de los genes y/o las enzimas codificadas por los genes. En particular, la invención está dirigida a genes derivados del hongo *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851) que codifican una ω 3 desaturasa novedosa (también referida en la presente memoria como Δ 17 desaturasa) y a una Δ 12 desaturasa novedosa. Estas enzimas catalizan la introducción de un doble enlace carbono-carbono entre una posición concreta dentro de un ácido graso sustrato. Por ejemplo, la ω 3 desaturasa novedosa descrita en la presente memoria cataliza la conversión de ácido araquidónico (20:4n-6) en ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) (así como otras reacciones de desaturación que implican otros sustratos). Del mismo modo, la Δ 12 desaturasa novedosa descrita en la presente memoria cataliza la conversión de ácido oleico (18:1n-9) en ácido linoleico (18:2n-6). Los PUFA formados de este modo se pueden añadir a composiciones farmacéuticas, composiciones nutricionales, alimentos para animales, u otros productos.

20 **Antecedentes**

Las desaturasas son una clase de enzimas críticas en la producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) juegan muchos papeles en el funcionamiento apropiado de todas las formas de vida. Por ejemplo, los PUFA son componentes importantes de la membrana plasmática de la célula, donde se encuentran en forma de fosfolípidos. Los PUFA también son precursores de las prostaciclina, eicosanoides, leucotrienos y prostaglandinas de mamíferos. Adicionalmente, los PUFA son necesarios para el desarrollo apropiado del cerebro del lactante, así como para la formación y reparación de tejidos en mamíferos maduros. A la vista de la trascendencia biológica de los PUFA, se están realizando intentos para producirlos de una manera eficaz.

Numerosas enzimas, muy notablemente desaturasas y elongasas, están implicadas en la biosíntesis de los PUFA (véase la Figura 1). Las elongasas catalizan la adición de una unidad de 2 carbonos a un ácido graso sustrato. De este modo, por ejemplo, una elongasa (genéricamente denominada “elo” en la Figura 1) cataliza la conversión de ácido γ -linolénico (18:3n-6) en ácido dihomo- γ -linolénico (20:3n-6), así como la conversión de ácido estearidónico (18:4n-3) en ácido eicosatetraenoico (20:4n-3), etc.

Las desaturasas catalizan la introducción de insaturaciones (esto es, dobles enlaces) entre átomos de carbono en la cadena alquílica del ácido graso del sustrato. De este modo, por ejemplo, el ácido linoleico (18:2n-6) es producido a partir de ácido oleico (18:1n-9) por la acción de una Δ 12 desaturasa. De un modo similar, el ácido γ -linolénico (18:3n-6) es producido a partir de ácido linoleico por la acción de una Δ 6 desaturasa.

En toda la presente solicitud, los PUFA serán identificados inequívocamente utilizando el sistema de nomenclatura “omega” aprobado por los fisiólogos y bioquímicos, en oposición al sistema “delta” o I.U.P.A.C. aprobado normalmente por los químicos. En el sistema “omega”, un PUFA es identificado por una designación numérica del número de carbonos de la cadena. Esta está seguida de dos puntos y después otra designación numérica del número de insaturaciones de la molécula. Esto está seguido después por la designación “n-x,” donde x es el número de carbonos desde el extremo metílico de la molécula donde está localizada la primera insaturación. Cada insaturación de la subsecuencia (donde hay más de un doble enlace) está localizada 3 átomos de carbono adicionales hacia el extremo carboxilo de la molécula. De este modo, los PUFA descritos en la presente memoria pueden ser descritos por ser PUFA “interrumpidos por metileno”. Cuando se requiere alguna otra designación, se indicarán las desviaciones del sistema “omega”.

Cuando sea apropiado, la acción de las enzimas desaturasas descritas en la presente memoria también será identificada utilizando el sistema “omega”. De este modo, una “omega-3” desaturasa cataliza la introducción de un doble enlace entre los dos carbonos en las posiciones 3 y 4 desde el extremo metilo del sustrato. No obstante, en muchos casos, es más conveniente indicar la actividad de una desaturasa contando desde el extremo carboxilo del sustrato. De este modo, como se muestra en la Figura 1, una Δ 9 desaturasa cataliza la introducción de un doble enlace entre los dos carbonos de las posiciones 9 y 10 desde el extremo carboxilo del sustrato. En resumen, cuando se utiliza el término “omega”, se está designando la posición en el sustrato con respecto al extremo metilo; cuando se utiliza el término “delta”, se está designando la posición en el sustrato con respecto al extremo carboxilo.

Se debe observar que los mamíferos no pueden desaturar ácidos graso sustrato más allá de la posición Δ 9 (esto es, una distancia de 9 átomos de carbono más allá del extremo carboxilo). De este modo, por ejemplo, los mamíferos no pueden convertir ácido oleico (18:1n-9) en ácido linoleico (18:2n-6); el ácido linoleico contiene una insaturación en la posición Δ 12. Del mismo modo, el ácido α -linolénico (18:3n-3) (que tiene insaturaciones en Δ 12 y Δ 15) no puede ser sintetizado por los mamíferos. Sin embargo, por ejemplo, los mamíferos pueden convertir ácido α -linolénico en ácido estearidónico (18:4n-3) por la acción de una Δ 6 desaturasa. (Véase la Figura 1. Véase también la publicación PCT WO 96/13591; El FASEB Journal, Resúmenes, Parte I, Resumen 3093, página A532 (Experimental Biology 98, San Francisco, CA, 18-22 Abril, 1998); y Patente de los Estados Unidos Núm. 5.552.306).

ES 2 310 652 T3

Refiriéndose todavía a la Figura 1, en mamíferos, hongos, y algas, el ácido estearidónico formado de ese modo es convertido en ácido eicosatetraenoico (20:4n-3) mediante la acción de una elongasa. Este PUFA se puede convertir después en ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) por medio de una $\Delta 5$ desaturasa. El ácido eicosapentaenoico se puede convertir después a su vez en ácido $\omega 3$ -docosapentaenoico (22:5n-3) por medio de una elongasa.

Otros eucariotas, incluyendo hongos y plantas, tienen enzimas que desaturan ácidos grasos sustrato en el carbono $\Delta 12$ (véase la publicación PCT WO 94/11516 y Patente de los Estados Unidos Núm. 5.443.974) y en el carbono delta-15 (véase la publicación PCT WO 93/11245). Los principales ácidos grasos poliinsaturados de los animales derivan por lo tanto de la dieta y/o de la desaturación y elongación del ácido linoleico o el ácido α -linolénico. A la vista de estas dificultades, todavía permanece la necesidad de aislar los genes implicados en la síntesis de PUFA. Idealmente, estos genes se originarían a partir de especies que naturalmente producen ácidos grasos que no son producidos naturalmente en los mamíferos. Estos genes podrían ser expresados después en un sistema microbiano, vegetal, o animal, que sería alterado de ese modo para producir cantidades comerciales de uno o más PUFA. Así, existe una necesidad definida de enzimas $\Delta 12$ - y $\Delta 17$ desaturasas, los respectivos genes que codifican estas enzimas; así como métodos recombinantes de producción de estas enzimas. Adicionalmente, existe la necesidad de aceites que contengan niveles de PUFA además de los presentes naturalmente. El acceso a tales enzimas $\Delta 12$ - y $\Delta 17$ desaturasas permite la producción de grandes cantidades de PUFA que no pueden ser sintetizados de novo en mamíferos. Estos PUFA pueden ser utilizados como agentes farmacéuticos y/o suplementos nutricionales.

20 Compendio de la invención

Una realización de la presente invención abarca una secuencia de nucleótidos aislada que comprende o es complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa, donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos 50% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 26 y el SEQ ID NO: 42.

La presente invención también incluye una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa, comprendiendo dicha secuencia de nucleótidos o complementaria a una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 50% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 41. En particular, la secuencia puede ser seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 25 y el SEQ ID NO: 41. La secuencia puede codificar una desaturasa funcionalmente activa que utiliza un ácido graso poliinsaturado como sustrato. Además, la secuencia de nucleótidos se puede aislar de un hongo, tal como *Saprolegnia diclina*.

Una realización adicional de la presente invención incluye un polipéptido purificado codificado por la secuencia de nucleótidos descrita antes.

La presente invención también incluye un polipéptido purificado que desatura un ácido graso poliinsaturado sustrato en un carbono omega-3 del sustrato y tiene una identidad de aminoácidos de al menos 50% con una secuencia de aminoácidos que comprende el SEQ ID NO: 26. El polipéptido puede desaturar un ácido graso sustrato que tiene 20 átomos de carbono.

Adicionalmente, la presente invención abarca un polipéptido purificado que desatura un ácido graso poliinsaturado sustrato en un carbono delta-12 del sustrato y tiene una identidad de aminoácidos de al menos 50% con el SEQ ID NO: 42. El polipéptido puede desaturar un ácido graso sustrato que tiene 18 átomos de carbono.

Otra realización de la presente invención incluye un método de producción de desaturasa que comprende las etapas de: aislar una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa, comprendiendo dicha secuencia de nucleótidos o complementaria a una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 50% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 25 y el SEQ ID NO: 41; construir un vector que comprende la secuencia de nucleótidos aislada; e introducir el vector en una célula anfitriona durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la expresión de la desaturasa codificada por la secuencia de nucleótidos aislada.

Una realización adicional de la presente invención incluye un vector que comprende: 1) una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa, correspondiendo dicha secuencia de nucleótidos a o complementaria a una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente 50% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 25 y el SEQ ID NO: 41, conectada operablemente a b) una secuencia reguladora.

Adicionalmente, otra realización de la presente invención incluye una célula anfitriona que comprende el vector anterior. La célula anfitriona puede ser, por ejemplo, una célula eucariótica seleccionada del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula vegetal y una célula fúngica. Con respecto a la célula anfitriona, la expresión de la secuencia de nucleótidos aislada del vector puede dar como resultado una célula anfitriona productora de un ácido graso poliinsaturado que no es producido en el tipo salvaje de la célula anfitriona.

Asimismo, la presente invención abarca una célula vegetal, planta, o tejido vegetal que comprende el vector descrito antes, donde la expresión de la secuencia de nucleótidos del vector da como resultado la producción de un ácido graso

ES 2 310 652 T3

poliinsaturado por la célula vegetal, planta o tejido vegetal. El vector de la célula vegetal, planta o tejido vegetal puede inducir la producción de un ácido graso poliinsaturado seleccionado del grupo que consiste en, por ejemplo, ácido linoleico, ácido eicosatetraenoico y ácido eicosapentaenoico. Asimismo, la invención incluye uno o más aceites vegetales o ácidos expresados por la célula vegetal, planta o tejido vegetal.

La invención también incluye una planta transgénica que comprende el vector descrito antes, donde la expresión de la secuencia de nucleótidos del vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado en las semillas de la planta transgénica.

Otra realización de la presente invención abarca un método de producción de un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de: aislar una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa, comprendiendo dicha secuencia de nucleótidos o complementaria a una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 50% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 25 y el SEQ ID NO: 41; construir un vector que comprende la secuencia de nucleótidos aislada; transformar el vector en una célula anfitriona durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión de una desaturasa codificada por la secuencia de nucleótidos aislada; y exponer la desaturasa expresada seleccionada del grupo que consiste en una omega-3 desaturasa y una delta-12 desaturasa, a un ácido graso sustrato, por medio de lo cual el sustrato es convertido catalíticamente por dicha desaturasa en un ácido graso poliinsaturado deseado producto. El sustrato es ácido dihomo-gama-linolénico o ácido araquidónico y el ácido graso poliinsaturado producto es ácido eicosatetraenoico o ácido eicosapentaenoico, respectivamente, cuando la desaturasa expresada es una omega-3 desaturasa. El ácido graso poliinsaturado sustrato es ácido oleico y el ácido graso poliinsaturado producto es ácido linoleico, cuando la desaturasa expresada es una delta-12 desaturasa.

El método puede comprender adicionalmente la etapa de exponer el ácido graso poliinsaturado producto a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una desaturasa y una elongasa, por medio de lo cual el ácido graso poliinsaturado producto es convertido catalíticamente en otro ácido graso poliinsaturado producto. El ácido graso poliinsaturado producto es ácido eicosatetraenoico o ácido eicosapentaenoico y el otro ácido graso poliinsaturado es ácido eicosapentaenoico o ácido omega-3-docosapentaenoico, respectivamente, cuando la desaturasa expresada es una omega-3 desaturasa. El ácido graso poliinsaturado producto es ácido linoleico y el otro ácido graso poliinsaturado es ácido gama-linolénico, cuando la desaturasa expresada es una delta-12 desaturasa.

Adicionalmente, el método descrito antes puede comprender adicionalmente la etapa de exponer el otro ácido graso poliinsaturado a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una desaturasa y una elongasa con el fin de convertir el otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final. El ácido graso poliinsaturado final se selecciona del grupo que consiste en ácido omega-3-docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, cuando la desaturasa expresada de la etapa (d) es una omega-3 desaturasa. Por el contrario, el ácido graso poliinsaturado final se selecciona del grupo que consiste en ácido dihomo-gama-linolénico, ácido araquidónico, ácido adrénico, ácido omega-6-docosapentaenoico, ácido eicosatetraenoico, ácido estearidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido omega-3-docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, cuando la desaturasa expresada es una delta-12 desaturasa.

Una realización adicional de la presente invención incluye un método de producción de un ácido graso poliinsaturado que comprende exponer un ácido graso sustrato a un polipéptido que tiene una identidad de aminoácidos de al menos 50% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 26 y el SEQ ID NO: 42, por medio de lo cual el ácido graso sustrato es convertido catalíticamente en el ácido graso poliinsaturado producto. El ácido graso sustrato es ácido dihomo-gama-linolénico o ácido araquidónico y el ácido graso poliinsaturado producto es ácido eicosatetraenoico o ácido eicosapentaenoico, respectivamente, cuando el polipéptido es una omega-3 desaturasa. En cambio, el ácido graso sustrato es ácido oleico y el ácido graso poliinsaturado producto es ácido linoleico, cuando el polipéptido es una delta-12 desaturasa.

La presente invención definida antes puede ser utilizada para proporcionar una composición que comprende al menos un ácido graso poliinsaturado seleccionado del grupo que consiste en el ácido graso poliinsaturado "producto" producido de acuerdo con el método descrito antes, el "otro" ácido graso poliinsaturado producido de acuerdo con el método descrito antes, y el ácido graso poliinsaturado "final" producido de acuerdo con el método descrito antes. El ácido graso poliinsaturado producto es ácido eicosatetraenoico o ácido eicosapentaenoico, cuando la desaturasa expresada es una omega-3 desaturasa. En cambio, el ácido graso poliinsaturado producto es ácido linoleico, cuando la desaturasa expresada es una delta-12 desaturasa. El otro ácido graso poliinsaturado es ácido eicosapentaenoico o ácido omega-3-docosapentaenoico, respectivamente, cuando la desaturasa expresada es una omega-3 desaturasa. Sin embargo, el otro ácido graso poliinsaturado es ácido gamma-linolénico, cuando la desaturasa expresada es una delta-12 desaturasa. El ácido graso poliinsaturado final se selecciona del grupo que consiste en ácido omega-3-docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, cuando la desaturasa expresada es una omega-3 desaturasa. En cambio, el ácido graso poliinsaturado final se selecciona del grupo que consiste en ácido dihomo-gama-linolénico, ácido araquidónico, ácido adrénico, ácido omega-6-docosapentaenoico, ácido eicosatetraenoico, ácido estearidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido omega-3-docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, cuando la desaturasa expresada es una delta-12 desaturasa.

La composición descrita antes se puede utilizar para prevenir o tratar una afección causada por una ingesta insuficiente de al menos un ácido graso poliinsaturado que comprende administrar al paciente la composición descrita antes en una cantidad suficiente para llevar a cabo la prevención o el tratamiento.

ES 2 310 652 T3

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema que muestra la ruta biosintética que conduce a la producción de diversos PUFA.

5 La Figura 2 es la secuencia de nucleótidos de *sdd17* (SEQ ID NO: 25), un gen derivado de *S. diclina* (ATCC 56851) que codifica una desaturasa de ácido graso ω 3 novedosa.

La Figura 3 es la secuencia de aminoácidos de la ω 3 desaturasa (SDD17) (SEQ ID NO: 26) codificada por la secuencia de nucleótidos representada en la Figura 2.

10 La Figura 4 es una comparación de la secuencia de aminoácidos entre la desaturasa SDD17 representada en la Figura 3 y una Δ 15 desaturasa conocida de *Synechocystis* sp. (SYCDESB).

15 La Figura 5 es una comparación de la secuencia de aminoácidos entre la desaturasa SDD17 representada en la Figura 3 y una Δ 17 desaturasa conocida de *C. elegans* (CELEFAT).

La Figura 6 es la secuencia de nucleótidos de *sdd12* (SEQ ID NO: 41), un gen derivado de *S. diclina* (ATCC 56851) que codifica una desaturasa de ácido graso Δ 12 novedosa.

20 La Figura 7 es la secuencia de aminoácidos de la Δ 12 desaturasa (SDD12) (SEQ ID NO: 42) codificada por la secuencia de nucleótidos representada en la Figura 6.

La Figura 8 es una comparación de la secuencia de aminoácidos entre la desaturasa SDD12 representada en la Figura 7 y una Δ 12 desaturasa conocida de *G. hirsutum* (GHO6DES).

25 La Figura 9 enumera los identificadores de secuencia de toda la solicitud así como las correspondientes secuencias de aminoácidos o de nucleótidos.

Descripción detallada de la invención

30 Abreviaturas utilizadas en la presente memoria:

18:1n-9 = ácido oleico = OA

35 18:2n-6 = ácido linoleico = LA

18:3n-6 = ácido gamma-linolénico = GLA

40 18:3n-3 = ácido alfa-linolénico = ALA

18:4n-3 = ácido estearidónico = STA

20:3n-6 = ácido dihomo-gamma-linolénico = DGLA

45 20:4n-6 = ácido araquidónico = AA

20:4n-3 = ácido eicosatetraenoico = ETA

20:5n-3 = ácido eicosapentaenoico = EPA

50 22:4n-6 = ácido adrénico

22:5n-3 = ácido omega-3-docosapentaenoico = DPA

55 22:6n-3 = ácido docosahexaenoico = DHA

PUFA = ácido graso poliinsaturado

60 La invención sujeto hace referencia a las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos traducida de los genes de la ω 3 desaturasa y la Δ 12 desaturasa aislados del hongo *Saprolegnia diclina* o *S. diclina* (ATCC 56851). Además, la invención sujeto también incluye los usos de estos genes y de las enzimas codificadas por estos genes. Por ejemplo, los genes y sus correspondientes enzimas se pueden utilizar en la producción de ácidos grasos poliinsaturados tales como ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico, y similares. Estos ácidos grasos pueden ser añadidos a composiciones farmacéuticas, composiciones nutricionales, y otros productos valiosos.

65 El hongo *S. diclina* (ATCC 56851), a partir del cual se aislaron los polinucleótidos descritos en la presente memoria, es asequible comercialmente de la Colección de Cultivos Tipo Americana, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110. El hongo se suministra congelado y puede ser propagado en medio ATCC 307 de agar harina de maíz

ES 2 310 652 T3

(Difco núm. 0386) a 24°C. Para una información adicional sobre este hongo, véase Beakes G. (1983) "A comparative account of cyst coat ontogeny in saprophytic and fish-lesion (pathogenic) isolates of the *Saprolegnia diclina*-parasitica complex". *Can. J. Bot.* 61, 603-625; y Willoughby L.G., *et al.* (1983) "Zoospore germination of *Saprolegnia* pathogenic to fish". *Trans. Br. Mycol. Soc.* 80, 421-435.

5

El Gen de la ω 3-Desaturasa, el Gen de la Δ 12-Desaturasa, y sus Enzimas Codificadas

Las enzimas codificadas por los genes de la omega-3 desaturasa y la delta-12 desaturasa de la presente invención son esenciales en la producción de PUFA que tienen al menos dos insaturaciones y una longitud total de 18 carbonos o más. La secuencia de nucleótidos del gen de la omega-3 desaturasa de *Saprolegnia diclina* aislado se muestra en el SEQ ID NO: 25 y en la Figura 2. La secuencia de este gen difiere significativamente de todos los genes de desaturasa conocidos, de cualquier fuente. La enzima omega-3 desaturasa codificada se muestra en el SEQ ID NO: 26 y en la Figura 3. La secuencia de nucleótidos del gen de la delta-12 desaturasa de *Saprolegnia diclina* aislado se muestra en el SEQ ID NO: 41 y en la Figura 6. Este gen también difiere significativamente de la secuencia de todos los genes de desaturasa conocidos, de cualquier fuente. La enzima delta-12 desaturasa codificada se muestra en el SEQ ID NO: 42 y en la Figura 7.

El gen de la omega-3 desaturasa aislado de la presente invención, cuando es transformado en un anfitrión de levadura, produce una enzima omega-3 desaturasa que cataliza rápidamente la conversión de DGLA en ETA, AA en EPA, y ácido adrenico en DPA (véase el Ejemplo 5). De una manera similar, el gen de la delta-12 desaturasa aislado de la presente invención, cuando es transformado en un anfitrión de levadura, produce una enzima delta-12 desaturasa que cataliza rápidamente la conversión de OA en LA (véase el Ejemplo 9).

Se debe observar que la presente invención también abarca las secuencias de nucleótidos (y las correspondientes proteínas codificadas) que tienen secuencias que comprenden, idénticos, o complementarios al menos en un 50%, preferiblemente al menos aproximadamente 60%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 70%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y muy preferiblemente al menos aproximadamente 90% de los nucleótidos (es decir, que tienen una identidad de secuencia con la secuencia) mostrados en el SEQ ID NO: 25 y el SEQ ID NO: 41 (es decir, las secuencias de nucleótidos del gen de la omega-3 desaturasa y el gen de la delta-12 desaturasa de *Saprolegnia diclina*, respectivamente) descritas en la presente memoria. (Todos los números enteros entre 50% y 100% también se consideran dentro del alcance de la presente invención con respecto al porcentaje de identidad). Tales secuencias pueden derivar de cualquier fuente, ya sea aisladas de una fuente natural, o producidas por medio de una ruta semi-sintética, o sintetizadas *de novo*. Tales secuencias pueden ser aisladas o estar derivadas de fuentes fúngicas, como también de otras fuentes no fúngicas, tales como bacterianas, de algas, de *C. elegans*, de ratón o humanas.

35

La identidad de secuencia o el porcentaje de identidad es el número exacto de emparejamientos entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de la secuencia más corta y multiplicado por 100. Un alineamiento aproximado para las secuencias de ácido nucleico es proporcionado por el algoritmo de la homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981). Este algoritmo se puede ampliar para utilizarlo con secuencias de péptidos o proteínas utilizando la matriz de puntuación creada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff ed., 5 Supl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, y normalizada por Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6):6745-66763 (1986). El Genetics Computer Group (GCG) (Madison, Wisconsin) proporciona un programa de ordenador que automatiza este algoritmo tanto para secuencias de ácido nucleico como de péptidos en la aplicación de utilidad "BestFit". Los parámetros por defecto de este método se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Versión 8 (1995) (asequible de GCG). Otros programas igualmente adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias son generalmente conocidos en la técnica.

La invención también incluye un polipéptido purificado que desatura los PUFA en la posición omega-3 y tiene al menos aproximadamente una similitud o identidad de aminoácidos del 50%, preferiblemente al menos aproximadamente una similitud o identidad de 60%, más preferiblemente al menos aproximadamente una similitud o identidad de 70%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente una similitud o identidad de 80%, y muy preferiblemente al menos aproximadamente una similitud o identidad de 90% con la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 26 (Figura 3) y codificado por la secuencia o las secuencias de nucleótidos observadas antes. (Todos los números enteros entre una similitud o identidad de 50% y 100% también están incluidos dentro del alcance de la invención).

La invención incluye adicionalmente un polipéptido purificado que desatura los PUFA en la posición delta-12 y tiene una similitud o identidad de al menos aproximadamente 50%, preferiblemente al menos aproximadamente una similitud o identidad de 60%, más preferiblemente al menos una similitud o identidad de aproximadamente 70%, incluso más preferiblemente una similitud o identidad de al menos aproximadamente 80%, y muy preferiblemente una similitud o identidad de al menos aproximadamente 90% con la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO:42 (Figura 7) que, a su vez, está codificado por la secuencia o las secuencias de nucleótidos anteriores. (Todos los números enteros entre una similitud o identidad de 50% y 100% también están incluidos dentro del alcance de la invención).

El término "identidad" hace referencia a la relación de dos secuencias nucleótido a nucleótido a lo largo de una ventana o segmento de comparación concreto. De este modo, la identidad se define como el grado de igualdad, correspondencia o equivalencia entre las mismas hebras (ya sean efectoras o antisentido) de dos segmentos de ADN. "El porcentaje de identidad de la secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de

65

ES 2 310 652 T3

una región concreta, determinando el número de posiciones en la cuales existe una base idéntica en ambas secuencias con el fin de proporcionar el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de tales posiciones por el número total de posiciones en el segmento que está siendo comparado y multiplicando el resultado por 100. El alineamiento óptimo de secuencias se puede llevar a cabo por el algoritmo de Smith & Waterman, Appl. Math. 2:482 (1981),
5 por el algoritmo de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por el método de Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444 (1988) y por programas de ordenador que implementan los algoritmos relevantes (p. ej., Clustal Macaw Pileup (<http://cmgm.stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>); Higgins *et al.*, CABIOS. 5L151-153 (1989)), FASTDB (Intelligenetics), BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschul *et al.*, Nucleic Acids Research 25:3389-3402 (1997)), PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) o GAP, BESTFIT, FASTA
10 y TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI). (Véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.912.120).

Para los fines de la presente invención, “la complementariedad” se define como el grado de relación entre dos segmentos de ADN. Se determina midiendo la capacidad de la hebra efectora de un segmento de ADN para hibridar
15 con la hebra antisentido del otro segmento de ADN, en condiciones apropiadas, para formar una doble hélice. Un “complemento” se define como una secuencia que se empareja con una secuencia dada basándose en las reglas de emparejamiento de bases canónicas. Por ejemplo, una secuencia A-G-T en una hebra de nucleótidos es “complementaria” a T-C-A en la otra hebra.

20 En la doble hélice, la adenina aparece en una hebra, la timina aparece en la otra hebra. De un modo similar, siempre que se encuentra guanina en una hebra, se encuentra citosina en la otra. A mayor relación entre las secuencias de nucleótidos de dos segmentos de ADN, mayor capacidad para formar dúplex híbridos entre las hebras de los dos segmentos de ADN.

25 La “similitud” entre dos secuencias de aminoácidos se define como la presencia de una serie de restos aminoácido idénticos así como conservados en ambas secuencias. A mayor grado de similitud entre dos secuencias de aminoácidos, mayor correspondencia, igualdad o equivalencia de las dos secuencias. (La “identidad entre dos secuencias de aminoácidos” se define como la presencia de una serie de restos aminoácido exactamente iguales o invariables en ambas secuencias). Las definiciones de “complementariedad”, “identidad” y “similitud” son bien conocidas por los
30 expertos normales en la técnica.

“Codificado por” hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptidos, donde la secuencia de polipéptidos o una porción de la misma contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 3
35 aminoácidos, más preferiblemente al menos 8 aminoácidos, e incluso más preferiblemente al menos 15 aminoácidos de un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico.

La presente invención también abarca una secuencia de nucleótidos aislada que codifica una actividad desaturasa de PUFA y que es hibridable, en condiciones moderadamente restrictivas, con un ácido nucleico que tiene una
40 secuencia de nucleótidos que comprende o es complementaria a la secuencia de nucleótidos que comprende el SEQ ID NO:25 o el SEQ ID NO:41. Una molécula de ácido nucleico es “hibridable” con otra molécula de ácido nucleico cuando una forma de hebra sencilla de la molécula de ácido nucleico puede recocerse con otra molécula de ácido nucleico en las condiciones de temperatura y fuerza iónica apropiadas (véase Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Segunda Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan el “grado de restricción” de la hibridación. La
45 “hibridación” requiere que dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias. No obstante, dependiendo del grado de restricción de la hibridación, se pueden producir emparejamientos erróneos entre las bases. El grado de restricción apropiado para la hibridación de ácidos nucleicos depende de la longitud los ácidos nucleicos y del grado de complementariedad. Tales variables son bien conocidas en la técnica. Más específicamente, a mayor grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor es el valor de T_m de los híbridos de los ácidos nucleicos
50 que tienen esas secuencias. Para los híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han obtenido ecuaciones para calcular la T_m (véase Sambrook *et al.*, *supra*). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, la posición de los emparejamientos erróneos se vuelve más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook *et al.*, *supra*).

55 Según se utiliza en la presente memoria, un “fragmento o secuencia de ácido nucleico aislado” es un polímero de ARN o ADN que es monocatenario o bicatenario, que contiene opcionalmente bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas. Un fragmento de ácido nucleico aislado en forma de un polímero de ADN puede estar formado por uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético. (Un “fragmento” de un polinucleótido especificado
60 hace referencia a una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia contigua de alrededor de al menos aproximadamente 6 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente 8 nucleótidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 10 nucleótidos, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 15 nucleótidos, y muy preferible al menos aproximadamente 25 nucleótidos idénticos o complementarios a una región de la secuencia de nucleótidos especificada). Los nucleótidos (encontrados normalmente en su forma 5'-monofosfato) son referidos por su denominación de una sola letra como sigue: “A” para adenilato o desoxiadenilato (para ARN o ADN, respectivamente), “C” para citidilato o desoxicitidilato, “G” para guanilato o desoxiguanilato “U” para uridilato, “T” para
65 desoxitimidilato, “R” para las purinas (A o G), “Y” para las pirimidinas (C o T), “K” para G o T, “H” para A o C o T, “I” para inosina, y “N” para cualquier nucleótido.

ES 2 310 652 T3

Los términos “fragmento o subfragmento que es funcionalmente equivalente” y “fragmento o subfragmento funcionalmente equivalente” se utilizan indistintamente en la presente memoria. Estos términos hacen referencia a una porción o subsecuencia de un fragmento de ácido nucleico aislado en el que la capacidad para alterar la expresión génica o producir un cierto fenotipo está conservada codifique o no el fragmento o subfragmento una enzima activa. Por ejemplo, se puede utilizar el fragmento o subfragmento en el diseño de constructos quiméricos para producir el fenotipo deseado en una planta transformada. Se pueden diseñar constructos quiméricos para su uso en la co-supresión o antisentido conectando un fragmento o subfragmento de ácido nucleico del mismo, codifique o no una enzima activa, en la orientación apropiada con respecto a una secuencia promotora de una planta.

Los términos “homología”, “homólogo”, “sustancialmente similar” y “sustancialmente correspondiente” se utilizan indistintamente en la presente memoria. Hacen referencia a fragmentos de ácido nucleico en los que uno o más cambios de bases nucleotídicas no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar la expresión génica o producir cierto fenotipo. Estos términos también hacen referencia a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención tales como delección o inserción de uno o más nucleótidos que no alteran sustancialmente las propiedades funcionales del fragmento de ácido nucleico resultante con respecto al fragmento inicial no modificado. Por lo tanto se entiende, como apreciarán los expertos en la técnica, que la invención abarca más de las secuencias ilustrativas específicas.

“Gen” hace referencia a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluyendo las secuencias reguladoras precedentes (secuencias no codificadoras 5’) y siguientes (secuencias no codificadoras 3’) a la secuencia codificadora.

“Gen nativo” hace referencia a un gen encontrado en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. Por el contrario, “constructo quimérico” hace referencia a una combinación de fragmentos de ácido nucleico que no se encuentran normalmente juntos en la naturaleza. Por consiguiente, un constructo quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que están derivadas de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente a la encontrada normalmente en la naturaleza. (El término “aislado” significa que la secuencia está separada de su entorno natural).

Un gen “foráneo” hace referencia a un gen no encontrado normalmente en el organismo anfitrión, si no que es introducido en el organismo anfitrión mediante transferencia de genes. Los genes foráneos pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o constructos quiméricos. Un “transgén” es un gen que ha sido introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.

“Secuencia codificadora” hace referencia a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica. Las “secuencias reguladoras” hacen referencia a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba (secuencias no codificadoras 5’), dentro, o aguas abajo (secuencias no codificadoras 3’) de una secuencia codificadora, y que influyen en la transcripción, maduración o estabilidad del ARN, o traducción de la secuencia codificadora asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir, pero no están limitadas a, promotores, secuencias líder de la traducción, intrones, y secuencias de reconocimiento de la poliadenilación.

“Promotor” hace referencia a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificadora o ARN funcional. La secuencia promotora consiste en elementos aguas arriba proximales y más distales, referidos los últimos elementos a menudo como potenciadores. Por consiguiente, un “potenciador” es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad promotora y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o especificidad de tejido de un promotor. Las secuencias promotoras también pueden estar localizadas en porciones transcritas de genes, y/o aguas abajo de las secuencias transcritas. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintéticos. Un experto en la técnica entiende que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, o en diferentes fases del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones medioambientales. Los promotores que hacen que un gen sea expresado en la mayoría de los tipos de células la mayoría de las veces son referidos comúnmente como “promotores constitutivos”. Constantemente se están descubriendo nuevos promotores de diversos tipos útiles en células vegetales; se pueden encontrar numerosos ejemplos en la recopilación de Okamoto y Goldberg, (1989) *Biochemistry of Plants* 15:1-82. Adicionalmente se reconoce que puesto que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no se han definido completamente, los fragmentos de ADN con ciertas variaciones pueden tener una actividad promotora idéntica.

Un “intrón” es una secuencia intermedia de un gen que no codifica una porción de la secuencia de proteína. De este modo, tales secuencias se transcriben a ARN pero después se escinden y no son traducidas. El término también se utiliza para las secuencias de ARN escindidas. Un “exón” es una porción de la secuencia de un gen que es transcrita y se encuentra en el ARN mensajero maduro derivado del gen, pero no es necesariamente una parte de la secuencia que codifica el producto génico final.

La “secuencia líder de la traducción” hace referencia a una secuencia de ADN localizada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificadora. La secuencia líder de la traducción está presente en el ARNm totalmente madurado aguas arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia líder de la traducción puede afectar a la maduración del transcrito primario en ARNm, a la estabilidad del ARNm o a la eficacia de la traducción. Se han descrito ejemplos de secuencias líder de la traducción (Turner, R. y Foster, G. D. (1995) *Molecular Biotechnology* 3:225).

ES 2 310 652 T3

Las “secuencias no codificadoras 3'” hacen referencia a secuencias de ADN localizadas aguas abajo de una secuencia codificadora e incluyen secuencias de reconocimiento de la poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar a la maduración del ARNm o a la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente por afectar a la adición de regiones de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias no codificadoras 3' es ilustrado por Ingelbrecht *et al.*, (1989) Plant Cell 1:671-680.

“Transcrito de ARN” hace referencia al producto resultante de la transcripción catalizada por ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, es referida como transcrito primario o puede ser una secuencia de ARN derivada de la maduración “post-traducciona” del transcrito primario y es referida como ARN maduro. “ARN mensajero (ARNm)” hace referencia al ARN que no tiene intrones y que puede ser traducido a proteína por la célula. “ADNc” hace referencia a un ADN que es complementario a y es sintetizado a partir de un molde de ARNm utilizando la enzima transcriptasa inversa. El ADNc puede ser de hebra sencilla o se puede convertir en una forma de doble hebra utilizando el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I. ARN “efector” hace referencia a un transcrito de ARN que incluye el ARNm y puede ser traducido a proteína en una célula o *in vitro*. “ARN antisentido” hace referencia a un transcrito de ARN que es complementario a todo o a una parte de un transcrito primario diana o ARNm y que bloquea la expresión de un gen diana (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.107.065). La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito del gen específico, esto es, en la secuencia no codificadora 5', en la secuencia no codificadora 3', en los intrones, o en la secuencia codificadora. El “ARN funcional” hace referencia a un ARN antisentido, un ARN ribozima, u otro ARN que no puede ser traducido pero todavía tiene efecto sobre los procesos celulares. Los términos “complemento” y “complemento inverso” se utilizan indistintamente en la presente memoria con respecto a transcritos de ARNm, y se pretende que definan el ARN antisentido del mensaje.

El término “ARN endógeno” hace referencia a cualquier ARN que está codificado por cualquier secuencia de ácido nucleico presente en el genoma del anfitrión antes de la transformación con el constructo recombinante de la presente invención, ya sea de origen natural o de origen no natural, esto es, introducido mediante métodos recombinantes, mutagénesis, etc.

El término “de origen no natural” significa artificial, que no coincide con lo que se encuentra normalmente en la naturaleza.

El término “conectado operablemente” hace referencia a la asociación de secuencias de ácido nucleico sobre un único fragmento de ácido nucleico de manera que la función de uno es regulada por el otro. Por ejemplo, un promotor está conectado operablemente con una secuencia codificadora cuando es capaz de regular la expresión de esa secuencia codificadora (esto es, que la secuencia codificadora está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificadoras pueden estar conectadas operablemente con secuencias reguladoras en orientación efectora o antisentido. En otro ejemplo, las regiones de ARN complementarias de la invención pueden estar conectadas operablemente, ya sea directamente o indirectamente, 5' con respecto al ARNm diana, o 3' con respecto al ARNm diana, o dentro del ARNm diana, o una primera región complementaria se encuentra en 5' y su complemento se encuentra en 3' con respecto al ARNm diana.

El término “expresión”, según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a la producción de un producto final funcional. La expresión de un gen implica la transcripción del gen y la traducción del ARNm a una proteína precursora o madura. La “inhibición antisentido” hace referencia a la producción de transcritos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. “Co-supresión” hace referencia a la producción de transcritos de ARN efectores capaces de suprimir la expresión de genes foráneos o endógenos idénticos o sustancialmente similares (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.231.020).

Proteína “madura” hace referencia a un polipéptido madurado post-traduccionalmente; esto es, uno del que se ha separado cualquiera de los pre- o propéptidos presentes en el producto de la traducción primaria. Proteína “precursora” hace referencia al producto primario de la traducción del ARNm; esto es, con los pre- y propéptidos todavía presentes. Los pre- y propéptidos pueden ser, pero no están limitados a, señales de localización intracelular.

“Transformación estable” hace referencia a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico a un genoma de un organismo anfitrión, incluyendo genomas nucleares y de orgánulos, dando como resultado una herencia genéticamente estable. En cambio, “transformación transitoria” hace referencia a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico a un núcleo, o un orgánulo que contiene ADN, de un organismo anfitrión dando como resultado una expresión génica sin integración o herencia estable. Los organismos anfitriones que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados son referidos como organismos “transgénicos”. El método preferido de transformación celular del arroz, maíz y otras monocotiledóneas es el uso de la tecnología de transformación por aceleración de partículas o “pistola génica” (Klein *et al.*, (1987) Nature (Londres) 327:70-73; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.945.050), o un método mediado por *Agrobacterium* utilizando un plásmido Ti apropiado que contenga el transgén (Ishida Y. *et al.*, 1996, Nature Biotech. 14:745-750). El término “transformación” según se utiliza en la presente memoria hace referencia tanto a la transformación estable como a la transformación transitoria.

Las técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular utilizadas en la presente memoria son bien conocidas en la técnica y las describen más completamente Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. Molecular Cloning: A

ES 2 310 652 T3

Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (referido en adelante como “Sambrook”).

5 El término “recombinante” hace referencia a una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo, p. ej., mediante síntesis química o mediante manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos mediante técnicas de ingeniería genética.

10 La “PCR” o “Reacción en Cadena de la Polimerasa” es una técnica para la síntesis de grandes cantidades de segmentos de ADN específicos, consiste en una serie de ciclos repetitivos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Típicamente, el ADN de doble hebra es desnaturalizado por calor, los dos cebadores complementarios a los límites 3’ del segmento diana son hibridados a bajas temperaturas y después prolongados a una temperatura intermedia. Un grupo de estas tres etapas consecutivas es referido como un ciclo.

15 La reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”) es una técnica potente utilizada para amplificar ADN millones de veces, mediante replicación repetida de un molde, en un corto período de tiempo. (Mullis *et al.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273 (1986); Erlich *et al.*, Solicitud de Patente Europea 50.424; Solicitud de Patente Europea 84.796; Solicitud de Patente Europea 258.017, Solicitud de Patente Europea 237.362; Mullis, Solicitud de Patente Europea 201.184, Mullis *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.683.202; Erlich, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.582.788; y Saiki *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.683.194). El procedimiento utiliza grupos de oligonucleótidos sintetizados *in vitro* específicos para cebar la síntesis de ADN. El diseño de los cebadores depende de las secuencias de ADN que se desean analizar. La técnica se lleva a cabo a través de muchos ciclos (normalmente 20-50) de fusión del molde a elevada temperatura, permitiendo que los cebadores hibriden con secuencias complementarias del molde y replicando después el molde con ADN polimerasa.

25 Los productos de las reacciones de PCR se analizan mediante separación en geles de agarosa seguido de tinción con bromuro de etidio y visualización con transiluminación UV. Alternativamente, se pueden añadir dNTP radiactivos a la PCR con el fin de incorporar una marca a los productos. En este caso los productos de la PCR son visualizados mediante la exposición del gel a una película de rayos X. La ventaja añadida del radiomarcado de los productos de la PCR es que se pueden cuantificar los niveles de productos de amplificación individuales.

30 Los términos “constructo recombinante”, “constructo de expresión” y “constructo de expresión recombinante” se utilizan indistintamente en la presente memoria. Estos términos hacen referencia a una unidad funcional de material genético que puede ser insertada en el genoma de una célula utilizando la metodología normalizada bien conocida por los expertos en la técnica. Semejante constructo puede encontrarse tal cual o se puede utilizar junto con un vector. Si se utiliza un vector, la elección del vector depende del método que se vaya a utilizar para transformar las plantas anfitrionas como es bien sabido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un vector plasmídico. El experto en la técnica está bien enterado de los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector con el fin de transformar, seleccionar y propagar con éxito las células anfitrionas que comprenden cualquiera de los fragmentos de ácido nucleico aislados de la invención. El experto en la técnica también reconocerá que diferentes eventos de transformación independientes darán como resultado diferentes niveles y patrones de expresión (Jones *et al.*, (1985) EMBO J. 4:2411-2418; De Almeida *et al.*, (1989) Mol. Gen. Genetics 218:78-86), y por lo tanto que se deben escrutar múltiples eventos con el fin de obtener líneas que presenten el nivel y patrón de expresión deseados. Semejante escrutinio debe ser completado mediante análisis Southern del ADN, análisis Northern de la expresión del ARNm, análisis Western de la expresión de la proteína, o análisis fenotípico.

45 *Expresión de los genes de la Omega-3 Desaturasa y la Delta-12 Desaturasa*

Una vez que los genes que codifican las enzimas omega-3 y delta-12 desaturasa han sido aislados, pueden ser introducidos en una célula anfitriona procariótica o eucariótica (individualmente o combinados) mediante el uso de un vector o un constructo. El vector, por ejemplo, un bacteriófago, cósmido o plásmido, puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera o ambas enzimas desaturasas, así como cualquier promotor que sea funcional en la célula anfitriona y sea capaz de lograr la expresión de la desaturasa o las desaturasas codificadas por las secuencias de nucleótidos. El promotor se encuentra en una asociación operable con, o está conectado operablemente a, la secuencia de nucleótidos. (Como se ha observado antes, se dice que una secuencia reguladora (p. ej., un promotor) está “conectada operablemente” a una secuencia codificadora si la secuencia reguladora afecta a la transcripción o la expresión de la secuencia codificadora. El promotor (u otro tipo de secuencia reguladora) no necesita estar directamente conectado a la secuencia codificadora. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos de genes que codifican los promotores de alcohol deshidrogenasa, gliceraldehído-3 fosfatodeshidrogenasa, fosfoglucoisomerasa, fosfoglicerato quinasa, fosfatasa ácida, T7, TPI, lactasa, metalotioneína, temprano inmediato de citomegalovirus, proteína ácida de suero, glucoamilasa, y promotores activados en presencia de galactosa, por ejemplo, GALL y GAL10. Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos que codifican otras proteínas, oligosacáridos, lípidos, etc. también pueden ser incluidas en el vector así como otras secuencias reguladoras tales como la señal de poliadenilación (p. ej., la señal poli-A del antígeno SV-40T, la ovalalbúmina o la hormona de crecimiento bovina), los marcadores de resistencia a antibióticos, los marcadores auxotróficos, y similares. La elección de las secuencias presentes en el constructo depende de los productos de expresión deseados, de la naturaleza de la célula anfitriona, y de los medios propuestos para separar las células transformadas de las células no transformadas.

ES 2 310 652 T3

Como se ha observado antes, una vez que el vector ha sido construido, puede ser introducido en la célula anfitriona de elección mediante métodos conocidos por los expertos normales en la técnica incluyendo, por ejemplo, la transfección, la transformación y la electroporación (véase *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). La célula anfitriona es cultivada después en condiciones adecuadas que permiten la expresión de los genes que conducen a la producción de los PUFA deseados, que después son recuperados y purificados. (Los sustratos que pueden ser producidos por la célula anfitriona naturalmente o transgénicamente, así como las enzimas que pueden ser codificadas por las secuencias de ADN presentes en el vector, que después son introducidos en la célula anfitriona, se muestran en la Figura 1).

Los ejemplos de las células anfitrionas procarióticas adecuadas incluyen, por ejemplo, bacterias tales como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, así como cianobacterias tales como *Spirulina* spp. (esto es, algas verde-azuladas). Los ejemplos de las células anfitrionas eucarióticas adecuadas incluyen, por ejemplo, células de mamífero, células vegetales, células de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Lipomyces starkey*, *Candida* spp. tal como *Yarrowia (Candida) lipolytica*, *Kluyveromyces* spp., *Pichia* spp., *Trichoderma* spp. o *Hansenula* spp., o células fúngicas tales como células fúngicas filamentosas, por ejemplo, *Aspergillus*, *Neurospora* y *Penicillium*. Preferiblemente, se utilizan células de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura panadera).

La expresión en una célula anfitriona se puede lograr de una manera transitoria o estable. La expresión transitoria se puede producir a partir de constructos introducidos que contienen señales de expresión funcionales en la célula anfitriona, pero cuyos constructos no replican y raramente se integran en la célula anfitriona, o cuando la célula anfitriona no es proliferativa. La expresión transitoria también se puede lograr induciendo la actividad de un promotor regulable conectado operablemente al gen de interés, aunque semejantes sistemas inducibles muestran frecuentemente un nivel basal de expresión bajo. La expresión estable se puede lograr introduciendo un constructo que se puede integrar en el genoma del anfitrión o que replique autónomamente en la célula anfitriona. La expresión estable del gen de interés se puede seleccionar mediante el uso de un marcador seleccionable localizado en o transfectedo simultáneamente con el constructo de expresión, seguido de la selección en cuanto a las células que expresan el marcador. Cuando se produce la expresión estable a partir de la integración, el sitio de integración del constructo puede producirse al azar dentro del genoma del anfitrión o puede ser dirigido mediante el uso de constructos que contienen regiones de homología con suficiente genoma del anfitrión para dirigir la recombinación con el locus del anfitrión. Cuando los constructos son dirigidos a un locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras de la transcripción y traducción pueden ser proporcionadas por el locus endógeno.

Asimismo se puede utilizar un mamífero transgénico con el fin de expresar las enzimas de la presente invención, y de este modo producir por último los PUFA de interés. Más específicamente, una vez que se ha creado el constructo descrito antes, este puede ser insertado en el pronúcleo de un embrión. El embrión puede ser implantado después en una hembra receptora. Alternativamente, también se puede utilizar un método de transferencia del núcleo (Schnieke *et al.*, *Science* 278:2130-2133 (1997)). Después se permite que se produzcan la gestación y el nacimiento (véase, p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.750.176 y Patente de los Estados Unidos Núm. 5.700.671). Las muestras de leche, tejido, u otros fluidos del vástago deben contener niveles alterados de los PUFA, en comparación con los niveles encontrados normalmente en el animal no transgénico. Las generaciones siguientes pueden ser controladas en cuanto a la producción de niveles alterados o intensificados de PUFA y de este modo la incorporación del gen o los genes que codifican las enzimas desaturadas deseadas en sus genomas. El mamífero utilizado como anfitrión se puede seleccionar del grupo que consiste, por ejemplo, en ratones, ratas, conejos, cerdos (suidos), cabras y ovejas (ovidos), caballos, y bóvidos. No obstante, se puede utilizar cualquier mamífero siempre que tenga capacidad para incorporar el ADN que codifica la enzima de interés en su genoma.

Para la expresión de un polipéptido de desaturasa, se conectan operablemente regiones de inicio y terminación de la transcripción y la traducción funcionales al ADN que codifica el polipéptido de la desaturasa de interés. Las regiones de inicio y terminación de la transcripción y la traducción derivan de una variedad de fuentes no exclusivas, incluyendo el ADN que se va a expresar, los genes que se sabe o se sospecha que son susceptibles de expresión en el sistema deseado, los vectores de expresión, la síntesis química, o de un locus endógeno de una célula anfitriona. La expresión en un tejido vegetal y/o parte de una planta presenta cierta eficacia, concretamente cuando el tejido o parte es uno que se cosecha temprano, tal como la semilla, las hojas, los frutos, las flores, las raíces, etc. La expresión puede estar dirigida a aquella localización de la planta utilizando secuencias reguladoras específicas tales como las de las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.463.174; 4.943.674; 5.106.739; 5.175.095; 5.420.034; 5.188.958; y 5.589.379.

Alternativamente, la proteína expresada puede ser una enzima que proporcione un producto, y ese producto puede ser incorporado, ya sea directamente o tras modificaciones adicionales, a una fracción de fluido de la planta anfitriona. La expresión de un gen de desaturasa, o transcritos de desaturasa antisentido, puede alterar los niveles de PUFA específicos, o derivados de los mismos, encontrados en partes de una planta y/o tejidos de una planta. La región que codifica el polipéptido de la desaturasa puede ser expresada tal cual o con otros genes, con el fin de producir tejidos y/o partes de una planta que contengan proporciones mayores de los PUFA deseados, o en los que la composición de PUFA se asemeje más íntimamente a la de la leche materna humana (Prieto *et al.*, publicación PCT WO 95/24494).

La región de terminación puede derivar de la región 3' del gen del cual se obtuvo la región de iniciación o de un gen diferente. Se conocen un gran número de regiones de terminación que son satisfactorias en una variedad de anfitriones de los mismos y diferentes géneros y especies. La región de terminación se selecciona normalmente por conveniencia en lugar de por cualquier propiedad concreta.

Como se ha observado antes, también se puede utilizar una planta (*p. ej.*, *Glycine max* (soja) o *Brassica napus* (canola)) o tejido vegetal como anfitrión o célula anfitriona, respectivamente, para la expresión de las enzimas desaturadas, que pueden ser utilizadas, a su vez, en la producción de PUFA. Más específicamente, los PUFA deseados pueden ser expresados en semillas. Los métodos de aislamiento de aceite de semillas son conocidos en la técnica. De este modo, además de proporcionar una fuente de PUFA, los componentes del aceite de las semillas pueden ser manipulados por medio de la expresión de los genes de las desaturadas, así como quizás otros genes de desaturada y genes de elongasa, para proporcionar aceites de semillas que pueden ser añadidos a composiciones nutricionales, composiciones farmacéuticas, alimentos para animales y cosméticos. Una vez más, un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica el gen de la desaturada de interés, conectado operablemente a un promotor, es introducido en el tejido vegetal o la planta durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la expresión del gen de la desaturada. El vector también puede comprender uno o más genes que codifican otras enzimas, por ejemplo, las enzimas delta-5 desaturada, elongasa, delta-12 desaturada, delta-15 desaturada, delta-17 desaturada, y/o delta-19 desaturada. El tejido vegetal o la planta pueden producir el sustrato relevante (*p. ej.*, ácido adrenico o DPA) sobre el cual actúa la enzima o se puede introducir un vector que codifica enzimas que producen tales sustratos en el tejido vegetal, la célula vegetal o la planta. Además, se pueden pulverizar sustratos adecuados sobre tejidos vegetales que expresan las enzimas apropiadas. Utilizando estas diversas técnicas, se pueden producir PUFA mediante el uso de una célula vegetal, tejido vegetal, o planta. Se debe observar también que la invención abarca asimismo una planta transgénica que comprende el vector descrito antes, donde la expresión de las secuencias de nucleótidos del vector da como resultado la producción de un PUFA deseado, por ejemplo, las semillas de la planta transgénica.

La regeneración, el desarrollo, y el cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplastos vegetales únicos o a partir de diversos explantes transformados son bien conocidos en la técnica (Weissbach y Weissbach, En: *Methods for Plant Molecular Biology*, (Eds.), Academic Press, Inc. San Diego, CA, (1988)). Este procedimiento de regeneración y crecimiento incluye típicamente las etapas de selección de las células transformadas, el cultivo de aquellas células individualizadas por medio de las fases habituales del desarrollo embrionario hasta la fase de plántula enraizada. Los embriones y las semillas transgénicas se regeneran de una manera similar. Los retoños enraizados transgénicos resultantes se plantan después en un medio de crecimiento vegetal apropiado tal como tierra.

El desarrollo o la regeneración de las plantas que contienen el gen exógeno, foráneo que codifica una proteína de interés es bien conocido en la técnica. Preferiblemente, las plantas regeneradas son auto-polinizadas para proporcionar plantas transgénicas homocigotas. Por otra parte, el polen obtenido a partir de las plantas regeneradas se cruza con plantas desarrolladas de semillas de líneas agrónomicamente importantes. Por el contrario, se utiliza el polen de plantas de estas líneas importantes para polinizar las plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención que contiene un polipéptido deseado se cultiva utilizando métodos bien conocidos por un experto en la técnica.

Existen una variedad de métodos para la regeneración de plantas a partir de tejido vegetal. El método concreto de regeneración dependerá del tejido vegetal de partida y de la especie vegetal concreta que se va a regenerar.

Los métodos para transformar dicotiledóneas, principalmente mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, y obtener plantas transgénicas ha sido publicado para el algodón (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.004.863, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.159.135, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.518.908); soja (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.569.834, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.416.011, McCabe *et al.*, *BioTechnology* 6:923 (1988), Christou *et al.*, *Plant Physiol.* 87:671-674 (1988)); Brassica (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.463.174); cacahuete (Cheng *et al.*, *Plant Cell Rep.* 15:653-657 (1996), McKently *et al.*, *Plant Cell Rep.* 14:699-703 (1995)); papaya; y guisante (Grant *et al.*, *Plant Cell Rep.* 15:254-258, (1995)).

También se ha informado de la transformación de monocotiledóneas utilizando electroporación, bombardeo de partículas, y *Agrobacterium*. Se han logrado la transformación y regeneración vegetal en espárrago (Bytebier *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84:5354, (1987)); cebada (Wan and Lemaux, *Plant Physiol* 104:37 (1994)); *Zea mays* (Rhodes *et al.*, *Science* 240:204 (1988), Gordon-Kamm *et al.*, *Plant Cell* 2:603-618 (1990), Fromm *et al.*, *BioTechnology* 8:833 (1990), Koziel *et al.*, *BioTechnology* 11: 194, (1993), Armstrong *et al.*, *Crop Science* 35:550-557 (1995)); avena (Somers *et al.*, *BioTechnology* 10: 15 89 (1992)); dátilo (Horn *et al.*, *Plant Cell Rep.* 7:469 (1988)); arroz (Toriyama *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 205:34, (1986); Part *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 32:1135-1148, (1996); Abedinia *et al.*, *Aust. J. Plant Physiol.* 24:133-141 (1997); Zhang and Wu, *Theor. Appl. Genet.* 76:835 (1988); Zhang *et al.*, *Plant Cell Rep.* 7:379, (1988); Battraw and Hall, *Plant Sci.* 86:191-202 (1992); Christou *et al.*, *Bio/Technology* 9:957 (1991)); ballico (De la Pena *et al.*, *Nature* 325:274 (1987)); caña de azúcar (Bower and Birch, *Plant J.* 2:409 (1992)); festuca alta (Wang *et al.*, *BioTechnology* 10:691 (1992)), y trigo (Vasil *et al.*, *Bio/Technology* 10:667 (1992); Patente de los Estados Unidos Núm. 5.631.152).

Se han desarrollado análisis para la expresión basada en la expresión transitoria de constructos de ácido nucleico clonados introduciendo moléculas de ácido nucleico en células vegetales mediante tratamiento con polietilenglicol, electroporación, o bombardeo de partículas (Marcotte *et al.*, *Nature* 335:454-457 (1988); Marcotte *et al.*, *Plant Cell* 1:523-532 (1989); McCarty *et al.*, *Cell* 66:895-905 (1991); Hattori *et al.*, *Genes Dev.* 6:609-618 (1992); Goff *et al.*, *EMBO J.* 9:2517-2522 (1990)).

Se pueden utilizar sistemas de expresión transitoria para analizar minuciosamente constructos génicos (véase generalmente, Maliga *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press (1995)). Se entiende que cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención puede ser introducida en una célula vegetal

de una manera permanente o transitoria combinada con otros elementos genéticos tales como vectores, promotores, potenciadores, etc.

Además de los procedimientos estudiados antes, los facultativos están familiarizados con los recursos materiales que describen las condiciones específicas y los procedimientos para la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas (p. ej., moléculas de ADN, plásmidos, etc.), generación de organismos recombinantes y escrutinio y aislamiento de clones, (véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989); Maliga *et al.*, Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor Press (1995); Birren *et al.*, Genome Analysis: Detecting Genes, 1, Cold Spring Harbor, New York (1998); Birren *et al.*, Genome Analysis: Analyzing DNA, 2, Cold Spring Harbor, New York (1998); Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual, eds. Clark, Springer, New York (1997)).

A la vista de lo anterior, la presente invención abarca un método de producción de una enzima omega-3 desaturasa y/o una delta-12 desaturasa, comprendiendo el método las etapas de: 1) aislar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima o las enzimas desaturasas deseadas; 2) construir un vector que comprende las secuencias de nucleótidos; y 3) introducir el vector en una célula anfitriona durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la producción de la enzima o las enzimas desaturasas.

La presente invención también abarca un método de producción de PUFA, comprendiendo el método exponer un ácido graso sustrato adecuado a la enzima de manera que la desaturasa convierta el ácido graso sustrato en un producto PUFA deseado. Por ejemplo, cuando AA (20:4n-6) se expone a la enzima omega-3 desaturasa de la presente invención, se convierte en EPA (20:5n-3). El EPA formado de ese modo se puede convertir en DPA (22:5n-3) por la acción de una elongasa, y el DPA se puede convertir con posterioridad en DHA (22:6n-3) por medio de una delta-4 desaturasa.

Del mismo modo, cuando se expone OA (18:1n-9) a la enzima delta-12 desaturasa de la presente invención, se convierte en LA (18:2n-6). El LA formado de ese modo se puede convertir virtualmente en todos los PUFA mostrados en la Figura 1 mediante las acciones posteriores de desaturasas y/o elongasas adecuadas.

30 Usos de los Genes de Desaturasa Sujeto y sus Enzimas Codificadas

Como se ha observado antes, los genes de desaturasa aislados y sus enzimas desaturasas codificadas tienen muchos usos. Por ejemplo, los genes y las correspondientes enzimas se pueden utilizar indirectamente o directamente, solos o combinados, en la producción de PUFA. Por ejemplo, la omega-3 desaturasa puede ser utilizada en la producción de ETA, EPA, DPA, DHA, y similares. Según se utiliza en este contexto, la palabra “directamente” abarca la situación en la que se utiliza la enzima para catalizar la conversión de un ácido graso sustrato directamente en el ácido graso producto deseado, sin ninguna etapa intermedia o rutas intermedias (p. ej., la conversión de AA en EPA). El producto así obtenido se utiliza después en una composición. “Indirectamente” abarca la situación en la que una desaturasa de acuerdo con la presente invención se utiliza para catalizar la conversión de un ácido graso sustrato en otro ácido graso (esto es, una ruta intermedia) por la desaturasa (p. ej., la conversión de AA en EPA) y después se convierte el último ácido graso (el EPA) en el ácido graso producto deseado mediante el uso de otra enzima desaturasa o no desaturasa (p. ej., la conversión de EPA en DPA mediante elongasa). Estos PUFA (esto es, aquellos producidos directamente o indirectamente por la actividad de las desaturasas sujeto) pueden ser añadidos, por ejemplo, a composiciones nutricionales, composiciones farmacéuticas, cosméticos, y alimentos para animales, todos los cuales están incluidos en la presente invención. Tales usos se describen con detalle más abajo.

Composiciones Nutricionales

La presente invención se puede utilizar para formar productos para su uso en composiciones nutricionales. Tales composiciones incluyen cualquier comida o preparación para consumo humano (incluyendo para consumo entérico y/o parenteral) que cuando son absorbidas en el organismo (a) sirven para sustentar o construir tejidos o suministrar energía; y/o (b) mantienen, restauran o apoyan un estado nutricional o una función metabólica adecuados.

La composición nutricional comprende un aceite, éster de ácido graso, o ácido graso producido directamente o indirectamente mediante el uso de los genes de desaturasa descritos en la presente memoria. La composición puede estar en forma sólida o líquida. Adicionalmente, la composición puede incluir macronutrientes, vitaminas y/o minerales comestibles en las cantidades deseadas para un uso concreto. Las cantidades de estos ingredientes variarán dependiendo de si la composición está destinada al uso en lactantes sanos, normales, niños, o adultos, o para su uso en individuos que tienen necesidades especiales, tales como individuos que padecen trastornos metabólicos y similares.

Los ejemplos de los macronutrientes que se pueden añadir a las composiciones incluyen (pero no están limitados a): grasas comestibles, carbohidratos y proteínas. Los ejemplos de tales grasas comestibles incluyen (pero no están limitados a): aceite de coco, aceite de borraja, aceite fúngico, aceite de grosella negra, aceite de soja, y mono- y diglicéridos. Los ejemplos de tales carbohidratos incluyen (pero no están limitados a): glucosa, lactosa comestible, y almidón hidrolizado. Adicionalmente, los ejemplos de las proteínas que se pueden utilizar en la composición nutricional de la invención incluyen (pero no están limitados a) proteínas de soja, suero sometido a electrodiálisis, leche desnatada sometida a electrodiálisis, suero de leche, o los productos hidrolizados de estas proteínas.

ES 2 310 652 T3

Con respecto a las vitaminas y minerales, se pueden añadir los siguientes a las composiciones nutricionales: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, selenio, yodo, y Vitaminas A, E, D, C, y el complejo B. También se pueden añadir otras de tales vitaminas y minerales.

5 Los componentes utilizados en las composiciones nutricionales serán de origen semi-purificado o purificado. Por semi-purificado o purificado se quiere significar un material que ha sido preparado mediante purificación de un material natural o mediante síntesis de novo.

10 Los ejemplos de las composiciones nutricionales incluyen (pero no están limitados a): fórmulas para lactantes, suplementos dietéticos, sustitutos dietéticos, y composiciones de rehidratación. Las composiciones nutricionales de particular interés incluyen (pero no están limitadas a) composiciones para suplemento entérico y parenteral para lactantes, fórmulas especializadas para lactantes, suplementos para ancianos, y suplementos para aquellos con dificultades gastrointestinales y/o mala absorción.

15 La composición nutricional también puede ser añadida a la comida incluso cuando no se requiere un suplemento para la dieta. Por ejemplo, se puede añadir la composición a comida de cualquier tipo, incluyendo (pero no limitados a): margarina, mantequilla modificada, quesos, leche, yogur, chocolate, dulces, aperitivos, aceites para ensaladas, aceites para cocinar, grasas para cocinar, carnes, pescado y bebidas.

20 En una realización preferida, la composición nutricional es un producto nutricional entérico, más preferiblemente, un producto nutricional entérico para adultos o pediátrico. Esta composición puede ser administrada a adultos o niños que padecen estrés o que tienen necesidades especializadas debidas a estados de enfermedad crónicos o agudos. La composición puede comprender, además de los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención, macronutrientes, vitaminas, y/o minerales, como se ha descrito previamente. Los macronutrientes pueden estar presentes en
25 cantidades equivalentes a las presentes en la leche humana o basándose en la energía, esto es, basándose en las calorías.

La fórmula entérica, por ejemplo, puede ser esterilizada y utilizada con posterioridad sobre una base lista para ingerir (RTF) o almacenada en un líquido o polvo concentrado. El polvo puede ser preparado mediante secado de rocío de la fórmula preparada como se ha indicado antes, y reconstitución del mismo rehidratando el producto concentrado.
30 Las fórmulas nutricionales para adultos y pediátricas son conocidas en la técnica y son asequibles comercialmente (p. ej., Similac®, Ensure®, Jevity® y Alimentum® de Ross Products Division, Abbott Laboratories, Columbus, Ohio). Se puede añadir un aceite o ácido graso producido de acuerdo con la presente invención a cualquiera de estas fórmulas.

35 La densidad de energía de las composiciones nutricionales, cuando se encuentran en forma líquida, puede oscilar entre aproximadamente 0,6 kcal y aproximadamente 3 kcal por ml. Cuando se encuentran en forma sólida o en polvo, los suplementos nutricionales pueden contener de aproximadamente 1,2 a más de 9 kcals por gramo, preferiblemente aproximadamente de 3 a 7 kcals por gm. En general, la osmolalidad de un producto líquido debe ser menor de 700 mOsm y, más preferiblemente, menor de 660 mOsm.

40 La fórmula nutricional puede incluir macronutrientes, vitaminas, y minerales, como se ha indicado antes, además de los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención. La presencia de estos componentes adicionales ayuda a la ingesta individual de los requerimientos mínimos de estos elementos. Además de la provisión de PUFA, puede ser deseable añadir cinc, cobre, ácido fólico, y antioxidantes a la composición. Se cree que estas sustancias refuerzan un sistema inmunitario estresado y por lo tanto proporcionarán ventajas adicionales al individuo que reciba la
45 composición. Una composición farmacéutica también puede recibir un suplemento con estos elementos.

En una realización más preferida, la composición nutricional comprende, además de antioxidantes y al menos un PUFA, una fuente de carbohidrato donde al menos 5% en peso del carbohidrato es un oligosacárido indigestible. En una realización más preferida, la composición nutricional comprende adicionalmente proteína, taurina y carnitina.

50 Como se ha observado antes, los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención, o los derivados de los mismos, se pueden añadir a un sustituto o un suplemento dietético, concretamente una fórmula para lactantes, para pacientes que están siendo sometidos a alimentación intravenosa o para prevenir o tratar la malnutrición u otras condiciones o estados de enfermedad. Como antecedente, se debe observar que la leche materna humana tiene un perfil
55 de ácido graso que comprende de aproximadamente 0,15% a aproximadamente 0,36% de DHA, de aproximadamente 0,03% a aproximadamente 0,13% de EPA, de aproximadamente 0,30% a aproximadamente 0,88% de AA, aproximadamente 0,22% a aproximadamente 0,67% de DGLA, y de aproximadamente 0,27% a aproximadamente 1,04% de GLA. De este modo, se pueden utilizar ácidos grasos tales como AA, EPA y/o DHA producidos de acuerdo con la presente invención para alterar, por ejemplo, la composición de las fórmulas para lactantes con el fin de reproducir
60 más exactamente el contenido de PUPA de la leche materna humana o para alterar la presencia de PUFA encontrados normalmente en la leche de mamífero no humana. En particular, una composición para su uso como agente medicinal o como suplemento alimenticio, concretamente un sustituto o suplemento de la leche materna, comprenderá preferiblemente uno o más de AA, DGLA y GLA. Más preferiblemente, la composición comprenderá de aproximadamente 0,3 a 30% de AA, de aproximadamente 0,2 a 30% de DGLA, y/o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 36%
65 de GLA.

Las composiciones nutricionales parenterales pueden comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 30% en peso de ácidos grasos calculados como triglicéridos.

ES 2 310 652 T3

La composición preferida tiene aproximadamente de 1 a aproximadamente 25% en peso de la composición de PUPA total en forma de GLA. Se pueden incluir opcionalmente otras vitaminas, concretamente vitaminas liposolubles tales como la vitamina A, D, E y L-carnitina. Cuando se desea, se puede añadir un conservante tal como alfa-tocoferol en una cantidad de aproximadamente 0,1% en peso.

Además, las proporciones de AA, DGLA y GLA se pueden adaptar para un uso final dado concreto. Cuando se formula en forma de suplemento o sustituto de la leche materna, se proporcionará una composición que comprende uno o más de AA, DGLA y GLA en una proporción de aproximadamente 1:19:30 a aproximadamente 6:1:0.2, respectivamente. Por ejemplo, la leche materna de animales puede variar en las proporciones de AA:DGLA:GLA oscilando entre 1:19:30 a 6:1:0.2, lo que incluye proporciones intermedias que son preferiblemente aproximadamente 1:1:1, 1:2:1, 1:1:4. Cuando se producen juntos en una célula anfitriona, se puede utilizar el ajuste de la velocidad y el porcentaje de conversión de un sustrato precursor tal como GLA y DGLA en AA para controlar las proporciones de PUFA precisamente. Por ejemplo, se puede utilizar una velocidad de conversión del 5% al 10% de DGLA en AA para producir una proporción de AA con respecto a DGLA de aproximadamente 1:19, mientras se puede utilizar una velocidad de conversión de aproximadamente 75% a 80% para producir una proporción de AA con respecto a DGLA de aproximadamente 6:1. Por lo tanto, ya sea en un sistema de cultivo celular o en un animal anfitrión, se puede utilizar la regulación del tiempo, el grado de especificidad de la expresión de la desaturasa, así como la expresión de otras desaturasas y elongasas, para modular los niveles y proporciones de PUFA. Los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención (p. ej., AA, EPA, etc.) pueden ser combinados después con otros PUFA u otros tipos de ácidos grasos a las concentraciones y proporciones deseadas.

Adicionalmente, los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención o las células anfitrionas transformadas para que contengan y expresen los genes de la desaturasa sujeto también pueden ser utilizados como suplementos alimenticios para animales para alterar la composición de ácidos grasos de un tejido o de la leche de un animal a uno más deseable para el consumo humano o animal.

Composiciones Farmacéuticas

Una composición farmacéutica puede comprender uno o más ácidos y/o aceites resultantes producidos utilizando los genes de desaturasa, de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Específicamente, semejante composición farmacéutica puede comprender uno o más de los PUFA y/o aceites, combinados con un portador, coadyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable no tóxico bien conocido normalizado tal como solución salina tamponada con fosfato, agua, etanol, polioles, aceites vegetales, un agente humectante o una emulsión tal como una emulsión de agua/aceite. La composición puede estar en forma líquida o sólida. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de comprimido, cápsula, líquido ingerible o polvo, inyectable, o pomada o crema tópica. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio, y similares. Además de tales diluyentes inertes, la composición también puede incluir coadyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y suspensores, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes y agentes perfumantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden comprender agentes suspensores tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietileno-sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, y tragacanto o mezclas de estas sustancias.

Se pueden preparar formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención pueden ser comprimidos con bases para comprimidos convencionales tales como lactosa, sacarosa, y almidón de maíz combinados con aglutinantes tales como acacia, almidón de maíz o gelatina, agentes disgregantes tales como almidón de patata o ácido alginico, y un lubricante tal como ácido esteárico o estearato de magnesio. Se pueden preparar cápsulas incorporando estos excipientes a una cápsula de gelatina junto con antioxidantes y los PUFA relevantes. Los componentes antioxidantes y los PUFA deben estar de acuerdo con las pautas presentadas antes.

Para la administración intravenosa, se pueden incorporar los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención o los derivados de los mismos a formulaciones comerciales tales como Intralipids®. El perfil de ácidos grasos del plasma adulto normal típico comprende de 6,64 a 9,46% de AA, de 1,45 a 3,11% de DGLA, y de 0,02 a 0,08% de GLA. Estos PUFA o sus precursores metabólicos se pueden administrar solos o combinados con otros PUFA para lograr un perfil de ácido graso normal en un paciente. Cuando se desea, se pueden proporcionar individualmente los componentes individuales de las formulaciones, o en forma de kit, para su uso único o múltiple. Una dosificación típica de un ácido graso concreto es de 0,1 mg a 20 g, tomados de una a cinco veces al día (hasta 100 g diarios) y se encuentra preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1, 2, 5, o 10 g diarios (tomados en una o en múltiples dosis).

Las posibles rutas de administración de las composiciones farmacéuticas incluyen, por ejemplo, entérica (p. ej., oral y rectal) y parenteral. Por ejemplo, una preparación líquida se puede administrar oralmente o rectalmente. Adicionalmente, una mezcla homogénea puede ser completamente dispersada en agua, mezclada en condiciones estériles con diluyentes, conservantes, tampones o propelentes fisiológicamente aceptables para formar una pulverización o un inhalante. La ruta de administración dependerá, por supuesto, del efecto deseado. Por ejemplo, si la composición se

ES 2 310 652 T3

va a utilizar para tratar la piel áspera, seca o envejecida, para tratar piel dañada o quemada, o para tratar piel o pelo afectado por una enfermedad o afección, se puede aplicar tópicamente.

5 La dosificación de la composición que se va a administrar al paciente puede ser determinada por un experto en la técnica y depende de diversos factores tales como el peso del paciente, la edad del paciente, la salud general del paciente, el historial del paciente, el estado inmunitario del paciente, etc.

10 Con respecto a la forma, la composición puede ser por ejemplo, una solución, una dispersión, una suspensión o un polvo estéril que después es reconstituido.

15 Se pueden tratar diversos trastornos mediante el uso de las composiciones farmacéuticas y/o nutricionales descritas en la presente memoria. En particular, se pueden utilizar las composiciones para tratar la restenosis posterior a la angioplastia. Además, también se pueden tratar con las composiciones síntomas de inflamación, artritis reumatoide, asma y psoriasis. La evidencia también indica que los PUFA pueden estar implicados en el metabolismo del calcio; de este modo, las composiciones pueden ser utilizadas en el tratamiento o la prevención de la osteoporosis y de las piedras en el riñón o el tracto urinario.

20 Adicionalmente, las composiciones también pueden ser utilizadas en el tratamiento del cáncer. Se ha demostrado que las células malignas tienen alteradas las composiciones de ácidos grasos. Se ha demostrado que la adición de ácidos grasos ralentiza su crecimiento, ocasiona la muerte celular y aumenta su susceptibilidad a los agentes quimioterapéuticos. Por otra parte, las composiciones también pueden ser útiles para tratar la caquexia asociada con el cáncer.

25 Las composiciones también pueden ser utilizadas para tratar la diabetes (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.826.877 y Horrobin *et al.*, Am. J. Clin. Nutr. Vol. 57 (Supl.) 732S-737S). Se han demostrado en animales diabéticos un metabolismo y una composición alterados de los ácidos grasos.

30 Además, las composiciones, que comprenden PUFA producidos directamente o indirectamente por medio del uso de enzimas desaturasas, también pueden ser utilizadas en el tratamiento del eczema y en la reducción de la presión sanguínea. Adicionalmente, las composiciones pueden ser utilizadas para inhibir la agregación de plaquetas, para inducir vasodilatación, para reducir los niveles de colesterol, para inhibir la proliferación de la pared de los vasos, el músculo liso y el tejido fibroso (Brenner *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 83, Págs. 85-101, 1976), para reducir o prevenir la hemorragia gastrointestinal y otros efectos secundarios de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.666.701), para prevenir o tratar la endometriosis y el síndrome premenstrual (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.758.592), y para tratar la encefalomiелitis miálgica y la fatiga crónica después de las infecciones virales (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.116.871).

35 Los usos adicionales de las composiciones incluyen el uso en el tratamiento del SIDA, la esclerosis múltiple, y los trastornos inflamatorios de la piel, así como en el mantenimiento de la salud general.

40 Adicionalmente, la composición puede ser utilizada con fines cosméticos. Puede ser añadida a composiciones cosméticas pre-existentes de manera que se forme una mezcla o se puede añadir un PUPA producido de acuerdo con la invención sujeto como único ingrediente "activo" en una composición cosmética.

45 *Aplicaciones Veterinarias*

Se debe observar que las composiciones farmacéuticas y nutricionales descritas antes se pueden utilizar con relación a animales (esto es, domésticos o no domésticos, incluyendo mamíferos, aves, reptiles, lagartos, etc.), así como a seres humanos, ya que los animales experimentan muchas de las necesidades y condiciones de los seres humanos. Por ejemplo, el aceite o los ácidos grasos producidos mediante los métodos de la presente invención pueden ser utilizados en suplementos de comidas para animales, sustitutos de comidas para animales, vitaminas para animales o en pomadas tópicas para animales.

55 La presente invención se puede ilustrar adicionalmente por medio de los ejemplos no limitantes presentados más abajo:

Ejemplo 1

60 *Construcción de la Genoteca de ADNc de Saprolegnia diclina (ATCC 56851)*

65 Para aislar los genes que codifican las enzimas desaturasas, se construyó una genoteca de ADNc. Se hicieron crecer cultivos de *Saprolegnia diclina* en medio de patata dextrosa (Difco núm. 336, BD Diagnostic Systems, Sparks, Maryland) a la temperatura ambiente durante cuatro días con agitación constante. Se recogieron los micelios mediante filtración a través de varias capas de estopilla, y los cultivos se trituraron en nitrógeno líquido utilizando un mortero y una mano de mortero. Los productos lisados celulares se resuspendieron en tampón RT (Qiagen, Valencia, California) que contenía β -mercaptoetanol y se incubaron a 55°C durante tres minutos. Esto productos lisados se homogeneizaron mediante aspiraciones repetidas a través de una jeringa o sobre una columna marca "QIAshredder" (Qiagen). El ARN total se purificó finalmente utilizando el kit marca "RNeasy Maxi" (Qiagen), según el protocolo del fabricante.

ES 2 310 652 T3

Se aisló el ARNm del ARN total de cada organismo utilizando una resina de oligo dT celulosa. Se utilizó el kit de construcción de genotecas marca "pBluescript II XR" (Stratagene, La Jolla, California) para sintetizar el ADNc de doble hebra. El ADNc de doble hebra se clonó direccionalmente (5' *EcoRI*/3' *XhoI*) en el vector pBluescript II SK(+) (Stratagene). La genoteca de *S. diclina* contenía aproximadamente $2,5 \times 10^6$ clones, cada uno con un tamaño de inserto de aproximadamente 700 pb. El ADN genómico de *S. diclina* se aisló triturando el cultivo en nitrógeno líquido seguido de purificación utilizando el kit con la marca de fábrica "Genomic DNA Extraction" (Qiagen), según el protocolo del fabricante.

10 Ejemplo 2

Determinación del Uso de Codones en Saprolegnia diclina

Se secuenciaron los extremos 5' de 350 clones de ADNc al azar a partir de la genoteca del ADNc de *Saprolegnia diclina* descrita en el Ejemplo 1. Las secuencias se tradujeron a seis marcos de lectura abiertos utilizando el programa GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) con el algoritmo con la marca de fábrica "FastA" para la búsqueda de la similitud entre una secuencia problema y un grupo de secuencias del mismo tipo, específicamente de la base de datos GenBank. Muchos de los clones fueron identificados como supuestos genes constitutivos basándose en la homología de la proteína con genes conocidos. De este modo se seleccionaron ocho secuencias de ADNc de *S. diclina*. Adicionalmente, también se utilizaron las secuencias de delta-5 desaturasa y delta-6 desaturasa de *S. diclina* completas (véase la Tabla 1 más abajo). Estas secuencias se utilizaron después para generar la tabla de preferencia codónica de *S. diclina* mostrada en la Tabla 2 más abajo empleando el programa "CodonFrequency" de GCG.

TABLA 1

Genes de Saprolegnia diclina utilizados para la generación de la Tabla de Preferencia Codónica			
Núm. Clon	Emparejamiento	Núm. bases	Núm. aminoácidos
3	Gen de Actina	615	205
20	Proteína ribosomal L23	420	140
55	Gen de la Proteína de Choque Térmico 70	468	156
83	Gen de la gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa	588	196
138	Gen de la proteína ribosomal S13	329	110
179	Gen de la alfa-tubulina 3	591	197
190	Gen de la subunidad alfa de la caseína quinasa II	627	209
250	Gen de ciclofilina	489	163
	Delta 6 desaturasa	1362	453
	Delta 5 desaturasa	1413	471
	Total	6573	2191

ES 2 310 652 T3

TABLA 2

Tabla de Preferencia Codónica para <i>Saprolegnia diclina</i>		
Aminoácido	Preferencia Codónica	% utilizado
Ala	GCC	55%
Arg	CGC	50%
Asn	AAC	94%
Asp	GAC	85%
Cys	TGC	77%
Gln	CAG	90%
Glu	GAG	80%
Gly	GGC	67%
His	CAC	86%
Ile	ATC	82%
Leu	CTC	52%
Lys	AAG	87%
Met	ATG	100%
Phe	TTC	72%
Pro	CCG	55%
Ser	TCG	47%
Thr	ACG	46%
Trp	TGG	100%
Tyr	TAC	90%
Val	GTC	73%
Parada	TGA	67%

Ejemplo 3

Diseño de Oligonucleótidos Degenerados para el Aislamiento de una Omega-3 Desaturasa de Saprolegnia diclina (ATCC 56851)

Los hongos como *Saprolegnia diclina* producen una amplia gama de PUFA, incluyendo ácido araquidónico (AA) y ácido eicosapentaenoico (EPA) por medio de la ruta biosintética de PUFA representada en la Figura 1. El análisis de la composición de ácidos grasos de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851) mostró que 15,42% de los lípidos totales eran

ES 2 310 652 T3

AA y 12,2% de los lípidos totales eran EPA (véase la Tabla 5). El ácido linoleico (LA) fue el único otro intermedio presente en grandes cantidades. Esto indica que *S. diclina* tiene delta-6 y delta-5 desaturasas muy activas, así como elongasas que desvían los intermedios a través de la ruta representada en la Figura 1. Debido al elevado porcentaje de EPA en este organismo, se prevé que exista una omega-3 desaturasa activa (sinónimo de “delta-15” desaturasa cuando el sustrato es un ácido graso C₁₈, de “delta-17” desaturasa cuando el sustrato es un ácido graso C₂₀, y de “delta-19” desaturasa cuando el sustrato es un ácido graso C₂₂) que es capaz de convertir AA (20:4n-6) en EPA (20:5n-3).

Como se acaba de indicar, las omega-3 desaturasas son enzimas que catalizan la introducción de un doble enlace en la posición delta-15 de las cadenas aciladas C₁₈, la posición delta-17 de las cadenas aciladas C₂₀, y la posición delta-19 de las cadenas aciladas C₂₂. Existen numerosas omega-3 desaturasas conocidas de plantas, pero estas actúan exclusivamente sobre sustratos de ácidos grasos C₁₈ como LA (18:2n-6) y GLA (18:3n-6). Estos tipos de desaturasas son referidos colectivamente como delta-15 desaturasas. En este momento, solamente se ha aislado un gen de omega-3 desaturasa cuya enzima codificada cataliza la desaturación de ácidos grasos sustrato C₁₈, C₂₀, y C₂₂. Este es *fat-1* de *C. elegans*. Véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.194.167, presentada el 27 de Febrero de 2001.

El enfoque utilizado en este Ejemplo para identificar una omega-3 desaturasa de *S. diclina* implicó la amplificación mediante PCR de una región del gen de la desaturasa utilizando oligonucleótidos degenerados (cebadores) que contenían motivos conservados presentes en otras omega-3 desaturasas conocidas. Se utilizaron las omega-3 desaturasas de los siguientes organismos para el diseño de estos cebadores degenerados: *Arabidopsis thaliana* (Swissprot núm. P46310), *Ricinus communis* (Swissprot núm. P48619), *Glycine max* (Swissprot núm. P48621), *Sesamum indicum* (Swissprot núm. P48620), *Nicotiana tabacum* (GenBank núm. D79979), *Perilla frutescens* (GenBank núm. U59477), *Capsicum annuum* (GenBank núm. AF222989), *Limnanthes douglassi* (GenBank núm. U17063), y *Caenorhabditis elegans* (GenBank núm. L41807). Se diseñaron algunos cebadores para que contuvieran los motivos de la caja histidina conservados que son componentes importantes del sitio activo de las enzimas. Véase Shanklin, J.E., McDonough, V.M., y Martin, C.E. (1994) *Biochemistry* 33, 12787-12794.

El alineamiento de secuencias se llevó a cabo utilizando el Programa CLUSTALW Multiple Sequence Alignment (<http://workbench.sdsc.edu>).

Se diseñaron los siguientes cebadores degenerados y se utilizaron en diversas combinaciones:

Motivo Proteico 1: NH₃- TRAAIPKHCWVK -COOH

Cebador RO1144 (directo): 5'-ATC CGC GCC GCC ATC CCC AAG CAC
TGC TGG GTC AAG-3' (SEQ ID NO: 1).

Motivo Proteico 2: NH₃- ALFVLGHDCGHGSFS -COOH

Este cebador contiene la caja histidina-1 (subrayada)

Cebador RO 1119 (directo): 5'- GCC CTC TTC GTC CTC GGC CAY
GAC TGC GGC CAY GGC TCG TTC TCG-3' (SEQ ID NO: 2).

Cebador RO 1118 (Inverso): 5'-GAG RTG GTA RTG GGG GAT CTG GGG
GAA GAR RTG RTG GRY GAC RTG-3' (SEQ ID NO: 3).

Motivo Proteico 3: NH₃- PYHGWRISHRTHHQN -COOH

Este cebador contiene la caja histidina 2 (subrayada).

Cebador RO 1121 (Directo): 5'-CCC TAC CAY GGC TGG CGC ATC TCG
CAY CGC ACC CAY CAY CAG AAC-3' (SEQ ID NO: 4).

Cebador RO 1122 (Inverso): 5'-GTT CTG RTG RTG GGT CCG RTG CGA
GAT GCG CCA GCC RTG GTA GGG-3' (SEQ ID NO: 5).

ES 2 310 652 T3

Motivo Proteico 4: NH₃- GSHF D/H P D/Y SDLFV -COOH

5 **Cebador RO 1146 (Directo):** 5' - GGC TCG CAC TTC SAC CCC KAC
TCG GAC CTC TTC GTC-3' (SEQ ID NO: 6).

10 **Cebador RO 1147 (Inverso):** 5' - GAC GAA GAG GTC CGA GTM GGG
GTW GAA GTG CGA GCC-3' (SEQ ID NO: 7).

Motivo Proteico 5: NH₃- WS Y/F L/V RGGLTT L/I DR -COOH

15 **Cebador RO 1148 (Inverso):** 5' - GCG CTG GAK GGT GGT GAG GCC
GCC GCG GAW GSA CGA CCA-3' (SEQ ID NO: 8).

Motivo Proteico 6: NH₃- HHDIGTHVIIHHLFPQ -COOH

25 Esta secuencia contiene la tercera caja histidina (subrayada).

30 **Cebador RO 1114 (Inverso):** 5' - CTG GGG GAA GAG RTG RTG GAT
GAC RTG GGT GCC GAT GTC RTG RTG-3' (SEQ ID NO: 9).

Motivo Proteico 7: NH₃- H L/F FP Q/K IPHYHL V/I EAT -COOH

35 **Cebador RO 1116 (Inverso):** 5' - GGT GGC CTC GAY GAG RTG GTA
RTG GGG GAT CTK GGG GAA GAR RTG-3' (SEQ ID NO: 10).

Motivo Proteico 8: NH₃-, HV A/I HH L/F FPQIPHYHL -COOH

45 Este cebador contiene la tercera caja histidina (subrayada) y es responsable de las diferencias entre las omega-3 desaturasas vegetales y la omega-3 desaturasa de *C. elegans*.

50 **Cebador RO 1118 (Inverso):** 5' -GAG RTG GTA RTG GGG GAT CTG GGG
GAA GAR RTG RTG GRY GAC RTG-3' (SEQ ID NO: 11).

El código de degeneración utilizado para los SEQ ID NOS: 1 a 11 fue el siguiente: R= A/G; Y=C/T; M=A/C; K=G/T; W=A/T; S=C/G; B=C/G/T; D=A/G/T; H=A/C/T; V=A/C/G; y N=A/C/G/T.

55 Ejemplo 4

Identificación y Aislamiento de un Gen de Omega-3 Desaturasa de Saprolegnia diclina (ATCC 56851)

60 Se utilizaron diversos grupos de los cebadores degenerados descritos en el Ejemplo 3 en reacciones de amplificación por PCR, utilizando como molde el ADN plasmídico de la genoteca de ADNc de *S. diclina* (del Ejemplo 1), o el ADN genómico de *S. diclina*. Asimismo se utilizaron diversas ADN polimerasas y condiciones de reacción diferentes para las amplificaciones mediante PCR. Estas reacciones implicaron utilizar la ADN polimerasa marca "Platinum Taq" (Life Technologies Inc., Rockville, Maryland), o ADNc polimerasa (Clontech, Palo Alto, California), o la mezcla Taq PCR (Qiagen), a diferentes temperaturas de hibridación.

ES 2 310 652 T3

La amplificación mediante PCR utilizando los cebadores RO 1121 (Directo) (SEQ ID NO: 4) y RO 1116 (Inverso) (SEQ ID NO: 10) dieron como resultado la amplificación con éxito de un fragmento homólogo a una omega-3 desaturasa conocida. El cebador RO 1121 (Directo) corresponde al motivo proteico 3; el cebador RO 1116 (Inverso) corresponde al motivo proteico 7.

5

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l que contenía: 3 μ l del molde de la genoteca de ADNc, tampón de PCR que contenía Tricina-KOH 40 mM (pH 9,2), KOAc 15 mM, Mg(OAc)₂ 3,5 mM, 3,75 μ g/ml de BSA (concentración final), 200 μ M de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 10 pmoles de cada cebador y 0,5 μ l de ADNc polimerasa con la marca de fábrica "Advantage" (Clonotech). La amplificación se llevó a cabo como sigue: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de los siguiente: 94°C durante 1 min, 60°C durante 30 seg, 72°C durante 1 min. Se llevó a cabo un ciclo de prolongación final de 72°C durante 7 min, seguido de la terminación de la reacción a 4°C.

10

Se generó una banda de PCR de ~480 pb que se resolvió sobre un gel de agarosa con la marca de fábrica "Sea-Kem Gold" al 1% (FMC BioProducts, Rockland, Maine), y se purificó en gel utilizando el Qiagen Gel Extraction Kit. Los extremos escalonados del fragmento se "rellenaron" utilizando la ADN polimerasa de T4 (Life Technologies, Rockville, Maryland) según las instrucciones del fabricante, y los fragmentos de ADN se clonaron en el vector PCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, California). Los plásmidos recombinantes se transformaron en células supercompetentes TOP10 (Invitrogen), y se secuenciaron ocho clones y se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos (Gen-EMBL).

20

Se encontró que todos los clones "sdd17-7-1" a "sdd17-7-8" contenían un inserto de ~483 pb. La secuencia de aminoácidos deducida de este fragmento mostró la mayor identidad con las siguientes proteínas (basadas en una búsqueda "tFastA"):

25

1. Identidad del 37,9% en el solapamiento de aminoácidos con una omega-3 (delta-15) desaturasa de *Synechocystis* sp. (Núm. de Acceso D13780).
2. Identidad del 40,7% en el solapamiento de 113 aminoácidos con la omega-3 desaturasa plastidial de *Picea abies* plastidial (Núm. de Acceso AJ302017).
3. Identidad del 35,9% en el solapamiento de 128 aminoácidos con la desaturasa de ácidos grasos FAD8 de *Zea mays* (Núm. de Acceso D63953).

30

Basándose en esta homología de secuencia con las desaturasas de ácidos grasos omega-3, parecía probable que este fragmento de ADN fuera parte de un gen de una omega-3 desaturasa presente en *S. diclina*.

35

La secuencia de ADN identificada antes se utilizó en el diseño de oligonucleótidos para aislar los extremos 3' y 5' de este gen de la genoteca de ADNc descrita en el Ejemplo 1. Para aislar el extremo 3' del gen, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

40

RO 1188 (Directo): 5'-TAC GCG TAC CTC ACG TAC TCG CTC G-3' (SEQ ID NO: 12).

RO 1189 (Directo): 5'-TTC TTG CAC CAC AAC GAC GAA GCG ACG-3' (SEQ ID NO: 13).

45

RO 1190 (Directo): 5'-GGA GTG GAC GTA CGT CAA GGG CAA C-3' (SEQ ID NO: 14).

RO 1191 (Directo): 5'-TCA AGG GCA ACC TCT CGA GCG TCG AC-3' (SEQ ID NO: 15).

50

Estos cebadores (SEQ ID NOS: 12-15) se utilizaron en combinaciones con el oligonucleótido vector pBluescript SK(+): RO 898: 5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA G-3' (SEQ ID NO: 16).

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo utilizando la polimerasa con la marca de fábrica "Taq PCR Master Mix" (Qiagen) o la ADNc polimerasa con la marca de fábrica "Advantage" (Clonotech) o la ADN polimerasa de Taq con la marca de fábrica "Platinum" (Life Technologies), como sigue:

55

Para la polimerasa "Taq PCR Master Mix", se utilizaron 10 pmoles de cada cebador junto con 1 μ l del ADN de la genoteca de ADNc del Ejemplo 1. La amplificación se llevó a cabo como sigue: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de lo siguiente: 94°C durante 1 min, 60°C durante 30 seg, 72°C durante 1 min. Se llevó a cabo un ciclo de prolongación final de 72°C durante 7 min, seguido de terminación de la reacción a 4°C. Esta amplificación dio como resultado las bandas más distintas en comparación con las otras dos condiciones sometidas a ensayo.

60

Para la reacción con la ADNc polimerasa con la marca de fábrica "Advantage", la amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l que contenía: 1 μ l del molde de la genoteca de ADNc del Ejemplo 1, tampón de PCR que contenía Tricina-KOH 40 mM (pH 9,2), KOAc 15 mM, Mg(OAc)₂ 3,5 mM, 3,75 μ g/ml de BSA (concentración final), 200 μ M de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 10 pmoles de cada cebador y 0,5 μ l de ADNc polimerasa (Clonotech). La amplificación se llevó a cabo como se describe para Taq PCR Master Mix.

65

ES 2 310 652 T3

Para la reacción con la ADN polimerasa de Taq con la marca de fábrica “Platinum”, se llevó a cabo la amplificación en un volumen total de 50 μ l que contenía: 1 μ l del molde de la genoteca de ADNc del Ejemplo 1, reacción para PCR que contenía Tris-Cl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM (concentración final), 200 μ M de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 10 pmoles de cada cebador, MgSO₄ 1,5 mM y 0,5 μ l de ADN polimerasa de Taq Platinum. La amplificación se llevó a cabo como sigue: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de lo siguiente: 94°C durante 45 seg, 55°C durante 30 seg, 68°C durante 2 min. La reacción se terminó a 4°C.

Los cuatro grupos de cebadores combinados con el cebador vector generaron distintas bandas. Las bandas de la PCR de la combinación (RO 1188 + RO 898) eran >500 pb y se purificaron en gel y se clonaron por separado. Las bandas de la PCR generadas de las otras combinaciones de cebadores fueron <500 pb. Las bandas fueron purificadas en gel, reunidas, y clonadas en el vector PCR-Blunt (Invitrogen) como se ha descrito antes. Los plásmidos recombinantes se transformaron en células supercompetentes TOP10 (Invitrogen) y los clones se secuenciaron y se analizaron.

Se encontró que los clones “sdd17-16-4” y “sdd16-6” que contenían el inserto de ~500 pb, y los clones “sdd17-17-6”, “sdd17-17-10”, y “sdd17-20-3”, que contenían los insertos de ~400 pb, contenían todos el extremo 3’ de la supuesta omega-3 desaturasa. Estas secuencias se solaparon entre sí, así como con el fragmento identificado originalmente de este supuesto gen de omega-3 desaturasa. Todas las secuencias contuvieron el codón de terminación “TAA” y una cola poli-A típica de los extremos 3’ de los genes eucarióticos. Esta secuencia del extremo 3’ fue homóloga a otras omega-3 desaturasas conocidas, compartiendo la mayor identidad (41,5% en un solapamiento de 130 aminoácidos) con la delta-15 desaturasa de *Synechocystis* (Núm. de Acceso D13780).

Para el aislamiento del extremo 5’ de este gen, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos y se utilizaron en combinaciones con el oligonucleótido vector pBluescript SK(+):

RO 899: 5’- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA AAC AGC -3’ (SEQ ID NO: 17).

RO 1185 (Inverso): 5’-GGT AAA AGA TCT CGT CCT TCT CGA TGT TGC-3’ (SEQ ID NO:19).

RO 1186 (Inverso): 5’-GTC AAA GTG GCT CAT CGT GC-3’ (SEQ ID NO: 19).

RO 1187 (Inverso): 5’-CGA GCG AGT ACG TGA GGT ACG CGT AC-3’ (SEQ ID NO: 20).

Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando la polimerasa con la marca de fábrica “Taq PCR Master Mix” (Qiagen) o la ADNc polimerasa con la marca de fábrica “Advantage” (Clontech) o la ADN polimerasa de Taq con la marca de fábrica “Platinum” (Life Technologies), como se ha descrito antes en la presente memoria para el aislamiento del extremo 3’.

Las bandas de PCR generadas a partir de combinaciones de cebadores (RO 1185 o RO 1186 + RO 899) estuvieron entre ~580 y ~440 pb y estas se reunieron y se clonaron en el vector PCR-Blunt como se ha descrito antes. Los clones generados de este modo incluyeron “sdd17-14-1”, “sdd17-14-10”, “sdd17-18-2”, y “sdd17-18-8,” todos los cuales mostraron homología con omega-3 desaturasas conocidas.

Adicionalmente, las bandas generadas a partir de (RO 1187 + RO 899) fueron de ~680 pb, y estas se clonaron por separado para generar los clones “sdd17-22-2” y “sdd17-22-5” que también mostraron homología con omega-3 desaturasas conocidas. Todos estos clones se solaparon entre sí, así como con el fragmento original de la supuesta omega-3 desaturasa conocida. Estas secuencias contenían un sitio ATG’ seguido de un marco de lectura abierto, indicando que éste es el sitio de inicio de este gen. Estos fragmentos mostraron la mayor identidad (39,7% en el solapamiento de 146 aminoácidos) con la delta-15 desaturasa de *Calendula officinalis* (Núm. de Acceso AJ245938).

La totalidad de esta omega-3 desaturasa se obtuvo mediante amplificación por PCR de la genoteca de ADNc de *S. diclina* utilizando los siguientes oligonucleótidos:

RO 1212 (Directo): 5’-TCA ACA GAA TTC ATG ACC GAG GAT AAG ACG AAG GTC GAG TTC CCG-3’ (SEQ ID NO: 21). Este cebador contiene el sitio de inicio “ATG” (subrayado sencillo) seguido de la secuencia 5’ de la omega-3 desaturasa. Además, se introdujo un sitio *EcoRI* (subrayado doble) aguas arriba del sitio de inicio para facilitar la clonación en el vector de expresión de levadura pYX242.

RO 1213 (Inverso): 5’-AAA AGA AAG CTT CGC TTC CTA GTC TTA GTC CGA CTT GGC CTT GGC-3’ (SEQ ID NO: 22). Este cebador contiene el codón de terminación “TAA” (subrayado sencillo) del gen así como la secuencia aguas abajo del codón de terminación. Esta secuencia se incluyó debido a que las regiones del gen eran muy ricas en G+C, y de este modo no pudieron ser incluidas en el diseño de oligonucleótidos para la amplificación por PCR. Además, se incluyó un sitio *HindIII* (subrayado doble) para la clonación conveniente en un vector de expresión de levadura pYX242.

La amplificación mediante PCR se llevó a cabo utilizando la polimerasa con la marca de fábrica “Taq PCR Master Mix” (Qiagen), 10 pmoles de cada cebador, y 1 μ l del ADN de la genoteca de ADNc del Ejemplo 1. La amplificación

ES 2 310 652 T3

se llevó a cabo como sigue: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de lo siguiente: 94°C durante 1 min, 60°C durante 30 seg, 72°C durante 1 min. Se llevó a cabo un ciclo de prolongación final de 72°C durante 7 min, seguido de la terminación de la reacción a 4°C.

5 De este modo se obtuvo una banda de PCR de ~1 kb y esta banda se aisló, se purificó, se clonó en el vector PCR-Blunt (Invitrogen), y se transformó en células TOP10. Los insertos se secuenciaron para verificar la secuencia del gen. El clon “sdd17-27-2” se digirió con *EcoRI/HindIII* para liberar el inserto completo, y este inserto se clonó en el vector de expresión de levadura pYX242, digerido previamente con *EcoRI/HindIII*. Este constructo contenía 1077 pb de sdd17 clonado en pYX242. Este constructo se etiquetó como pRSP19, que se transformó en SC344 de levadura para los estudios de expresión.

Además, se clonó el gen omega-3 de *S. diclina* en otro vector de expresión de levadura, pYES2 (Invitrogen). Para esto, se aisló el gen de la omega-3 desaturasa de la genoteca de ADNc generada en el Ejemplo 1 mediante amplificación por PCR (como se ha descrito antes) utilizando los siguientes oligonucleótidos:

15 RO1221 (Directo) (SEQ ID NO: 23) 5'-TCA ACA **AAG CTT** ATG ACC GAG GAT AAG ACG AAG GTC GAG TTC CCG-3'

Este cebador contiene el sitio de inicio 'ATG' (subrayado) seguido de la secuencia 5' de la omega-3 desaturasa. Además, se introdujo un sitio *HindIII* (negrita) aguas arriba del sitio de inicio para facilitar la clonación en el vector de expresión de levadura pYES2.

RO1222 (Inverso) (SEQ ID NO: 24) 5'-AAA AGA **GAA TTC** CGC TTC CTA GTC TTA GTC CGA CTT GGC CTT GGC-3' Este cebador contiene el codón de terminación “TAA” (subrayado) del gen así como la secuencia aguas abajo del codón de terminación. Esta secuencia se incluyó puesto que las regiones del gen eran muy ricas en G+C, y de este modo no pudieron ser incluidas en el diseño de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR. Además, se incluyó un sitio *EcoRI* (negrita) para la clonación conveniente en el vector de expresión de levadura pYES2.

30 La banda de PCR de ~1 kb generada de este modo se digirió con *HindIII/EcoRI*, y se clonó en pYES2 digerido con las mismas enzimas de restricción. El constructo resultante (*sdd17* + pYES2) se etiquetó como pRSP20, y se utilizó en los estudios de expresión simultánea.

Asimismo se realizaron intentos para aislar el gen *sdd17* completo del ADN genómico mediante amplificación por PCR. Sin embargo, el producto de la PCR obtenido era mayor de 1077 pb (~1,15 kb), y la secuenciación de este producto reveló la presencia de pequeños intrones en la secuencia genómica.

El gen completo de esta supuesta omega-3 desaturasa (etiquetada como *sdd17*) tenía 1077 pb de longitud y se muestra en la Figura 2 (SEQ ID NO: 25).

40 El gen de SEQ ID NO: 25 codificó una proteína de 358 restos aminoácido (SEQ ID NO: 26) (Figura 3). Una búsqueda de la secuencia de la proteína deducida de *sdd17* (utilizando el programa “tFastA”) mostró que la proteína tenía la mayor identidad (41% en el solapamiento de 269 aminoácidos) con la delta-15 desaturasa de *Synechocystis* sp. (Núm. de Acceso ATCC 13780) (Figura 4) y *Synechocystis* sp. PCC6803 (Núm. de Acceso ATCC D90913). Esta proteína compartía similitudes de secuencia con otras diversas omega-3 desaturasas vegetales. La comparación de esta secuencia de la proteína pronosticada con la enzima FAT1 de *C. elegans* (Núm. de Acceso ATCC L41807) reveló solamente una identidad de 31,6% en el solapamiento de 310 aminoácidos (Figura 5).

50 Como todas las omega-3 desaturasas, esta enzima no contiene un dominio citocromo b5 en el extremo 5' de su secuencia. El dominio citocromo b5 está presente en la mayoría de las enzimas de desaturación “frontal” como las delta-5- y delta-6 desaturasas. La omega-3 desaturasa descrita en este ejemplo incluye las tres secuencias ricas en histidina que están presentes en todas las desaturasas unidas a la membrana. Estos tres dominios están presentes en la posición 89 a 93 (HDCGH), 125 a 129 (HRHHH), y 284 a 288 (HQVHH) del SEQ ID NO: 26. Se cree que estas cajas ricas en histidina coordinan la estructura dihierro-oxo en el sitio activo de la enzima, y son necesarias para la actividad enzimática; véase Stukay, J.E., McDonough, V.M. & Martn, C.E. (1990) J. Biol. Chem. 265, 20144-20149. Estos rasgos coinciden con que la proteína “SDD17” sea un miembro de la familia de las desaturasas/hidroxilasas unidas a la membrana de las proteínas dihierro-oxo. El contenido de G+C de este gen es de 61,8%.

60 Ejemplo 5

Expresión del Gen de la Omega-3 Desaturasa (“sdd17”) de Saprolegnia diclina en Levadura Panadera

65 Para determinar la especificidad de sustrato y la clase de reacción catalizada por la proteína SDD17, se expresó heterológicamente *sdd17* en *Saccharomyces cerevisiae* (SC334). Debido a que *S. cerevisiae* no puede sintetizar ácidos grasos más allá de OA (18:1n-9), éste es un sistema ideal para su uso para determinar la actividad enzimática sobre sustratos más largos que OA ya que no se detectará actividad enzimática de fondo. Se pueden suministrar exógenamente

ES 2 310 652 T3

al anfitrión ácidos grasos sustrato adecuados que son absorbidos por la célula y atacados por la proteína expresada del gen *sdd17* transformado.

5 El clon pRSP19, que contenía la omega-3 desaturasa completa (*sdd17*) de *S. diclina* clonada en pYX242, se transformó en *Saccharomyces cerevisiae* (SC334) utilizando el kit con la marca de fábrica “Alkali-Cation Yeast Transformation” (BIO 101, Vista, California). Los transformantes se seleccionaron en cuanto a la auxotrofia para leucina en medio carente de leucina (DOB [-Leu]). Para detectar la actividad desaturasa específica de estos clones, se hicieron crecer los transformantes en presencia de 50 μ M de cada uno de LA (18:2n-6), GLA (18:3n-6), DGLA (20:3n-6), AA (20:4n-6), y ácido adrenico (22:4n-6). La conversión de estos ácidos grasos sustrato suministrados exógenamente en un producto que tiene una insaturación adicional indica la presencia de una actividad desaturasa específica que no se encuentra en *S. cerevisiae* de tipo salvaje:

La conversión de LA (18:2n-6) en ALA (18:3n-3) indica actividad delta-15 desaturasa.

15 La conversión de GLA (18:3n-6) en STA (18:4n-3) indica actividad delta-15 desaturasa.

La conversión de DGLA (20:3n-6) en ETA (20:4n-3) indica actividad delta-17 desaturasa.

20 La conversión de AA (20:4n-6) en EPA (20:5n-3) indica actividad delta-17 desaturasa.

La conversión de ácido adrenico (22:4n-6) en DPA (22:5n-3) indica actividad delta-19 desaturasa.

La cepa de control negativo fue *S. cerevisiae* transformada con el vector pYX242. Los cultivos experimentales y los cultivos de control se hicieron crecer simultáneamente y se analizaron.

25 Los cultivos se agitaron vigorosamente (250 rpm) y se hicieron crecer durante 48 horas a 24°C en presencia de 50 μ M (concentración final) de los diversos sustratos (véase la Tabla 3). Las células se centrifugaron, se lavaron una vez en agua destilada, y los sedimentos se resuspendieron en metanol; se añadió cloroformo junto con tritridecanoína (como patrón interno). Estas mezclas se incubaron durante al menos una hora a la temperatura ambiente, o a 4°C durante la noche. La capa de cloroformo se extrajo y se filtró a través de un filtro Whatman con 1 g de sulfato de sodio anhidro para eliminar el material particulado y el agua residual. Los disolventes orgánicos se evaporaron a 40°C en una corriente de nitrógeno. Los lípidos extraídos se convirtieron después en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para el análisis mediante cromatografía de gases (GC) añadiendo 2 ml de hidróxido de potasio en metanol 0,5 N a un tubo cerrado. Las muestras se calentaron a 95°C-100°C durante 30 minutos y se enfriaron a la temperatura ambiente. Se añadieron aproximadamente 2 ml de trifluoruro de boro en metanol al 14% y se repitió el calentamiento. Una vez que la mezcla de lípidos extraídos se hubo enfriado, se añadieron 2 ml de agua y 1 ml de hexano para extraer los FAME para el análisis mediante GC. El porcentaje de conversión se calculó utilizando la fórmula:

40

$$\% \text{ Conversión} = \frac{[\% \text{ Producto}]}{[\% \text{ Producto} + \% \text{ Sustrato}]} \times 100$$

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 310 652 T3

TABLA 3

Expresión en Levadura de la Omega-3 Desaturasa (SDD17) de <i>Saprolegnia diclina</i> a 24°C				
Clon	Sustrato* Incorporado	Producto Producido	% Conversión	Actividad Enzimática
PRSP19	18:2 n-6 (9,42%)	18:3 n-3 (0%)	0	Delta 15
	18:3 n-6 (9,11%)	18:4 n-3 (0%)	0	Delta 15
	20:3 n-6 (21,36%)	20:4 n-3 (1,18%)	5%	Delta 17
	20:4 n-6 (32,14%)	20:5 n-3 (5,16%)	13,8%	Delta 17
	22:4 n-6 (28,65%)	22:5 n-3 (1,22%)	4%	Delta 19
Control (pYX242)	18:2 n-6 (9,27%)	18:3 n-3 (0%)	0	Delta 15
	18:3 n-6 (9,18%)	18:4 n-3 (0%)	0	Delta 15
	20:3 n-6 (14,19%)	20:4 n-3 (0%)	0	Delta 17
	20:4 n-6 (26,56%)	20:5 n-3 (0%)	0	Delta 17
	22:4 n-6 (16,4%)	22:5 n-3 (0%)	0	Delta 19
<p>* sustrato utilizado 50 µM Los números entre paréntesis representan ácidos grasos como porcentaje de los lípidos totales de levadura.</p>				

18:2n-6 = ácido linoleico	20:3n-6= ácido dihomo-gamma linolénico
18:3n-6= ácido gamma-linolénico	20:4n-6= ácido araquidónico
18:3n-3= ácido alfa-linolénico	22:4n-6= ácido adrénico
18:4n-3= ácido estearidónico	20:4n-3= ácido eicosa-tetraenoico
20:5n-3= ácido eicosa-pentaenoico	22:5n-3= ácido omega-3-docosapentaenoico

La Tabla 3 presenta la actividad enzimática del producto proteico codificado por sdd17 de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851). Esta enzima es una omega-3 desaturasa activa capaz de desnaturalizar ácidos grasos sustrato omega-6 C₂₀ y C₂₂ para producir los correspondientes ácidos grasos omega-3 producto. Esta enzima convirtió 13,8% del

ES 2 310 652 T3

AA sustrato añadido en el correspondiente EPA producto, indicando de este modo la actividad delta-17 desaturasa. Además, esta enzima también podía actuar sobre DGLA, convirtiéndolo en ETA, como cabría esperar para una delta-17 desaturasa. En este Ejemplo, sin embargo, solamente 5% del DGLA añadido era convertido en ETA, indicando que en las condiciones utilizadas aquí, la enzima tiene una preferencia por el sustrato para AA en comparación con DGLA.

La actividad de esta enzima hacia los ácidos grasos sustrato C₂₂ también fue investigada debido a que los ácidos grasos omega-3 C₂₂ como DPA y DHA tienen importantes implicaciones dietéticas y farmacéuticas. A partir de la Tabla 3, se puede observar que esta enzima era activa sobre sustratos C₂₂ tales como el ácido adrenico, convirtiendo 4% del mismo en DPA. Como se puede observar a partir de los cultivos de control, no hubo una conversión no específica de sustrato añadido exógenamente en producto en *S. cerevisiae* no transformada.

La Tabla 4 demuestra que esta omega-3 desaturasa (SDD17) también funciona a una temperatura más baja, (esto es 15°C). Aquí, se añadieron 50 µM de sustrato exógeno a los transformantes y los cultivos se hicieron crecer durante 48 horas a 15°C. Se llevó a cabo el análisis de ácidos grasos como se ha descrito antes. La absorción total de sustrato por *S. cerevisiae* a 15°C fue inferior a la observada a 24°C (compárese la Tabla 3 y la Tabla 4). Sin embargo, el porcentaje de conversión de sustrato en producto por la enzima aumentó a 15°C. Puesto que la presencia de una concentración inferior de ácido graso sustrato exógeno pareció mejorar la actividad de la enzima, es posible que los ácidos grasos sustrato a concentraciones elevadas puedan ejercer una inhibición por retroalimentación sobre esta enzima. Se pueden llevar a cabo estudios adicionales para determinar el efecto de diferentes concentraciones de sustrato y diferentes temperaturas sobre la expresión de esta omega-3 desaturasa en *S. cerevisiae*.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 310 652 T3

TABLA 4

Expresión en Levadura de la Omega-3 Desaturasa (SDD17) de <i>Saprolegnia diclina</i> a 15°C				
Clon	Sustrato* Incorporado	Producto Producido	% Conversión	Actividad Enzimática
PRSP19	18:2 n-6 (8,79%)	18:3 n-3 (0%)	0	Delta 15
	18:3 n-6 (12,69%)	18:4 n-3 (0%)	0	Delta 15
	20:3 n-6 (9,52%)	20:4 n-3 (1,46%)	13%	Delta 17
	20:4 n-6 (8,69%)	20:5 n-3 (2,05%)	19%	Delta 17
	22:4 n-6 (6,68%)	22:5 n-3 (0,62%)	8,4%	Delta 19
Control (pYX242)	18:2 n-6 (9,65%)	18:3 n-3 (0%)	0	Delta 15
	18:3 n-6 (13,55%)	18:4 n-3 (0%)	0	Delta 15
	20:3 n-6 (10,17%)	20:4 n-3 (0%)	0	Delta 17
	20:4 n-6 (16,58%)	20:5 n-3 (0%)	0	Delta 17
	22:4 n-6 (11,05%)	22:5 n-3 (0%)	0	Delta 19
* Sustrato utilizado 50 µM				

Los números entre paréntesis representan los ácidos grasos como un porcentaje de los lípidos totales de levadura

18:2n-6 = Acido linoleico	20:3n-6= ácido dihomo-gamma-linolénico
18:3n-6= ácido gamma-linolénico	20:4n-6= ácido araquidónico
18:3n-3= ácido alfa-linolénico	22:4n-6= ácido adrénico
18:4n-3= ácido estearidónico	20:4n-3= ácido eicosa-tetraenoico
20:5n-3= ácido eicosapenta-eonoico	22:5n-3= ácido omega-3-docosapentaenoico

ES 2 310 652 T3

A diferencia de todas las omega-3 desaturasas conocidas, la enzima que codifica *sdd17* no desaturó ninguno de los ácidos grasos omega-6 C₁₈ sustrato a sus correspondientes ácidos grasos omega-3 (en las condiciones sometidas a ensayo). Es posible que *in vivo*, esta enzima funcione exclusivamente sobre AA, convirtiéndolo en EPA. Esto coincidiría con el perfil de ácidos grasos de *S. diclina* que presenta grandes cantidades de AA y EPA, pero pocos o ninguno de los otros intermedios omega-3 (Tabla 5).

TABLA 5

Ácido Graso	% Lípidos Totales
C10:0	0,22
C12:0	0,1
C13:0	3,98
C14:0	6,0
C14:1 n-5	0,29
C15:0	1,06
C16:0	19,75
C16:1 n-7	1,99
C18:0	3,99
C18: n-9	15,39
C18:1 n-7	7,39
C18:1 n-5	0,43
C18:2 n-6	7,07
C18:3 n-6	2,13
C18:3 n-3	0,08
C20:0	0,76
C20:1 n-9	0,15
C20:1 n-7	0,08
C20:2 n-6	0,22
C20:3 n-6	1,31
C20:4 n-6	15,42
C20:5n-3	12,2

De este modo, *sdd17* codifica una omega-3 desaturasa novedosa, capaz de desaturar ácidos grasos C₂₀ y C₂₂ sustrato. La proteína SDD17 puede ser fácilmente expresada en un sistema heterólogo y de este modo tiene potencial para su uso en otros sistemas heterólogos como plantas. Esta enzima es muy diferente de otras omega-3 desaturasas, que muestran actividad sobre ácidos grasos sustrato C₂₀ y C₂₂, pero no sobre sustratos C₁₈. Comparte solamente un 31,6% de identidad con FAT-1, la única otra deaturasa conocida capaz de actuar sobre ácidos grasos sustrato omega-6 C₂₀ y C₂₂. De este modo la enzima codificada por *sdd17* es una omega-3 desaturasa novedosa.

Ejemplo 6

65 *Expresión Simultánea de Omega-3 Desaturasa de S. diclina con Otras Enzimas*

El constructo pRSP20 que consiste en *sdd17* clonada en el vector de expresión de levadura pYES2, como se describe en el Ejemplo 3, se utilizó en estudios de expresión simultánea con otras desaturasas y elongasas. pRSP3,

ES 2 310 652 T3

un constructo que contenía el gen de la delta-5 desaturasa (SEQ ID NO: 27) de *S. diclina* clonado en el vector de expresión de levadura pYX242, fue co-transformado con pRSP20 en levadura. El protocolo de transformación fue el descrito en el Ejemplo 4. Esta delta-5 desaturasa cataliza la conversión de DGLA en AA y de ETA en EPA. Los co-transformantes se seleccionaron sobre medio mínimo que carecía de leucina y Uracilo (DOB [-Leu-Ura]).

La Tabla 6 muestra que cuando se añadieron 50 μM de DGLA sustrato (20:3 n-6), la delta-5 desaturasa lo convirtió en AA (20:4, n-6), y la omega-3 desaturasa fue capaz de desaturar adicionalmente AA a EPA (24:5, n-3). El porcentaje de conversión del sustrato en producto final fue del 5%, sin observarse fondo en el control negativo.

TABLA 6

Estudios de Expresión Simultánea con la Omega-3 Desaturasa (SDD17) de <i>S. diclina</i>					
Clon	Plásmido en levadura	20:3 n-6 (DGLA) Incorporado	20:4 n-6 (AA) Producido	20:5 n-3 (EPA) Producido	% Conversión
Cntrl	pYX242 + pYES2	19,33	0	0	0
pRSP22	pRSP3 (Delta 5) + pRSP20 (omega-3 desaturasa)	20,56	2,64	0,14	5%
Clon	Plásmido en levadura	18:3 n-6 (GLA) Incorporado	20:3 n-6 (DGLA) Producido	20:4 n-3 (ETA) Producido	% Conversión
Cntrl	pYX242 + pYES2	4,83	0	0	0
pRSP23	pRAT-4-A7 (elongasa) + pRSP20 (omega-3 desaturasa)	4,56	9,30	0,14	1,4%
* sustrato utilizado 50 μM					
Los números representan el ácido graso como un porcentaje de los lípidos totales de levadura					
18:3n-6= ácido gamma-linolénico					
20:3n-6= ácido dihomo-gamma-linolénico					
20:4n-6= ácido araquidónico					
20:4n-3= ácido eicosatetraenoico					
20:5n-3= ácido eicosapentaenoico					

ES 2 310 652 T3

$$\% \text{ Conversión} = \frac{[\% \text{ Producto 1} + \% \text{ Producto 2}]}{[\% \text{ sustrato } \% \text{ Producto 1} + \% \text{ Producto 2}]}$$

5 La Tabla 6 también muestra los resultados de un experimento de co-transformación que implica a pRSP20 y pRAT-4-A7, una elongasa obtenida de *Thraustochytrid* sp. 7091 (SEQ ID NO: 28) clonada en pYX242. Esta elongasa cataliza la adición de dos carbonos más al PUFA pre-existente. Cuando se añaden 50 μM del GLA sustrato (18:3 n-6) a los co-transformantes, la elongasa prolongaba GLA a DGLA, y el DGLA era desaturado adicionalmente por la omega-3 desaturasa a ETA (20:4 n-3). El porcentaje de conversión de sustrato en producto final fue de 1,4%, sin observarse fondo en el control negativo.

10 De este modo la omega-3 desaturasa de *S. diclina* era capaz de utilizar un producto formado, en un sistema de expresión heterólogo, por otra enzima heteróloga de la ruta biosintética de PUFA, y de convertir ese producto en el PUFA esperado.

15 Se debe observar que la expresión (y por tanto la actividad) de *sdd17* cuando era clonada en el vector pYES2 (pRSP20) era mucho menor que cuando era clonada en el vector pYX242 (pRSP19). Esto debe ser explicado por la diferencia en los promotores de expresión presentes en cada vector. El promotor pYX242 es un promotor constitutivo y es mucho más fuerte que el promotor inducible por galactosa en pYES2. Se han realizado observaciones similares durante los estudios de expresión con otras desaturasas cuando fueron clonadas en estos dos vectores de expresión.

20 Se pueden llevar a cabo estudios de co-expresión adicionales utilizando pRSP19 en lugar de pRSP20 junto con otras desaturasas y elongasas. Asimismo se puede co-expresar la omega-3 desaturasa de *S. diclina* con otras enzimas como la delta-4 desaturasa pRTA7 (SEQ ID NO: 29), donde el ácido adrenico (22:4 n-6) puede ser añadido como sustrato y el producto final DHA (22:6 n-3) puede ser producido debido a la acción concertada de la omega-3 desaturasa y la delta-4 desaturasa.

30 Ejemplo 7

Diseño de Cebadores Degenerados para el Aislamiento del gen de la Delta 12-Desaturasa de Saprolegnia diclina ATCC 56851

35 El análisis de la composición de ácidos grasos de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851) reveló la presencia de una cantidad considerable de LA, lo que sugirió la presencia de una delta-12 desaturasa muy activa (Tabla 5). Las delta-12 desaturasas utilizan OA como sustrato, catalizando de este modo la conversión de OA en LA (véase la Figura 1). Las delta-12 desaturasas están presentes solamente en plantas, hongos, e insectos, pero no en mamíferos, incluyendo seres humanos. De este modo el LA es un ácido graso "esencial" en los seres humanos debido a que no puede ser sintetizado *in vivo*. El LA es desaturado y prolongado adicionalmente para producir importantes compuestos intracelulares como GLA, AA, y EPA.

40 El objetivo de este experimento fue aislar el gen de la delta-12 desaturasa de *S. diclina* y verificar su funcionalidad expresando la enzima en un sistema anfitrión heterólogo tal como levadura. El enfoque adoptado fue diseñar cebadores degenerados (oligonucleótidos) que representan motivos de aminoácidos conservados de las delta-12 desaturasas conocidas. En el diseño de estos cebadores, se utilizó información sobre la secuencia de la delta-12 desaturasa conocida de fuentes fúngicas y vegetales, incluyendo la información de las secuencias de: *Mortierella alpina* (Núm. de Acceso AF110509), *Mucor rouxii* (Núm. de Acceso AF161219), *Brassica juncea* (Núm. de Acceso X91139), *Arabidopsis thaliana* (Núm. de Acceso L26296), y *Borago officinalis* (Núm. de Acceso AF0744324). La información de las secuencias se analizó utilizando el programa CODEHOP Blockmaker (<http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>).

Los cebadores degenerados utilizados en este Ejemplo fueron los siguientes:

Motivo proteico 1: NH₃- P N/E FTIKEIR D/E A/C IPAHCF -COOH

55 **Cebador RO 967 (Directo):** 5'-CCG SAG TTC ACS ATC AAG GAG ATC
CGC GAS KSC ATC CCG GCC CAC TGC TTC -3' (SEQ ID NO: 30).

Motivo proteico 2: NH₃- MP H/F YHAEAT V/Y H I/L KK A/L -COOH

60 **Cebador RO 968 (Inverso):** 5'-GRS CTT CTT GAK GTG GWM SGT GGC
CTC CTC GGC GTG GTA GWR CGG CAT-3' (SEQ ID NO: 31).

ES 2 310 652 T3

Motivo proteico 3: NH₃- P L/V YW A/I C/M/A QG V/I V L/G/C TGVW -COOH

Cebador RO 964 (Directo): 5'-CCS STC TAC TGG GCC TGC CAG GGT

5 RTC GTC CTC ACS GGT GTC TGG-3' (SEQ ID NO: 32).

Esta secuencia es más similar a las delta-12 desaturasas vegetales conocidas.

Cebador RO 965 (Directo): 5'-CCS STC TAC TGG ATC RYS CAG GGT

10 RTC GTC KGY ACS GGT GTC TGG-3' (SEQ ID NO: 33).

15 Esta secuencia es más similar a las delta-12 desaturasas fúngicas conocidas.

Motivo proteico 4: NH₃- HVAHH L/F FS T/Q MPHYHA -COOH

Cebador RO 966 (Inverso): 5'-GGC GTG GTA GTG CGG CAT SMM CGA

20 GAA GAR GTG GTG GGC GAC GTG-3' (SEQ ID NO: 34).

25 El código degenerado utilizado para los oligonucleótidos fue el siguiente: R= A/G; Y=C/T; M=A/C; K=G/T; W=A/T; S=C/G; B=C/G/T; D=A/G/T; H=A/C/T; V=A/C/G; N=A/C/G/T.

Ejemplo 8

30 *Identificación y Aislamiento del Gen de la Delta 12-Desaturasa de Saprolegnia diclina (ATCC 56851)*

35 Para aislar un fragmento del gen de la delta-12 desaturasa de *S. diclina*, se llevó a cabo la PCR utilizando la genoteca de ADNc de *S. diclina* del Ejemplo 1 como molde. Se utilizaron los cebadores en las siguientes combinaciones: (RO 964 + RO 966), (RO 965 + RO 966), y (RO 967 + RO 968). La PCR se llevó a cabo en volúmenes de 100 μ l utilizando la polimerasa con la marca de fábrica "Taq PCR Master Mix" (Qiagen). Se utilizaron 10 pmoles de cada cebador junto con 1 μ l de ADN de la genoteca de ADNc. La amplificación se llevó a cabo como sigue: desnaturalización inicial a 94°C durante 4 min, seguido de 25 ciclos de lo siguiente: 94°C durante 1 min, 47°C durante 1 min, 72°C durante 2 min. Se llevó a cabo un ciclo de prolongación final de 72°C durante 5 min, seguido de terminación de la reacción a 4°C.

45 La amplificación con (RO 964 + RO 966) o (RO 965 + RO 966) dio como resultado distintas bandas de ~688 pb de longitud. La amplificación con (RO 967 + RO 968) dio como resultado una banda distinta de ~660 pb. Estas bandas se resolvieron sobre un gel de agarosa con la marca de fábrica "SeaKem Gold" al 1% (FMC BioProducts), y se purificaron en gel utilizando el Qiagen Gel Extraction Kit. Los extremos escalonados se "rellenaron" utilizando ADN polimerasa de T4 (Life Technologies), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los fragmentos de ADN se clonaron después en el vector PCR-Blunt (Invitrogen). Los plásmidos recombinantes se transformaron en células supercompetentes TOP10 (Invitrogen), los clones se secuenciaron, y se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos (Gen-EMBL).

50 Se encontró que los clones "sdd12-1-8", "sdd12-2-8", y "sdd12-5-1" se solapaban todos entre sí, y estos fragmentos solapantes se alinearon utilizando el programa con la marca de fábrica "ASSEMBLE" (GCG) para crear un único fragmento de fusión de ~900 pb. Una búsqueda "tFastA" con los aminoácidos deducidos de esta secuencia de fusión mostró la máxima identidad con las siguientes proteínas:

55 identidad del 49% en el solapamiento de 298 aminoácidos con la delta-12 desaturasa de *Borago officinalis* (Núm. de Acceso AF074324) e identidad del 46,7% en el solapamiento de 332 aminoácidos con la delta-12 desaturasa de *Sesamum indicum* (Núm. de Acceso AF192486).

60 Basándose en la elevada identidad con las delta-12 desaturasas conocidas, se consideró que el fragmento era una región del gen de la delta-12 desaturasa de *S. diclina*. Este fragmento se utilizó para diseñar cebadores para retirar los extremos 5' y 3' del gen.

Para aislar el extremo 3' del gen, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

65 RO 975 (Directo): 5'-CAC GTA CCT CCA GCA CAC GGA CAC CTA CG-3' (SEQ ID NO: 35)

RO 976 (Directo): 5'-GAT CGA CAG CGC GAT CCA CAT TGC-3' (SEQ ID NO: 36).

ES 2 310 652 T3

Estos se utilizaron en combinaciones con el oligonucleótido del vector pBluescript SK(+) RO 898: 5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA G-3' (SEQ ID NO: 16).

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo utilizando la polimerasa con la marca de fábrica "Taq PCR Master Mix" (Qiagen) como sigue: se utilizaron 10 pmoles de cada cebador junto con 1 μ l de ADN de la genoteca de ADN del Ejemplo 1 como molde. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de lo siguiente: 94°C durante 1 min, 60°C durante 30 seg, 72°C durante 1 min. Se llevó a cabo un ciclo de prolongación final de 72°C durante 7 min, seguido de terminación de la reacción a 4°C.

La combinación de cebadores (RO 898 + RO 975) generó una banda de PCR de ~390 pb y la combinación de cebadores (RO 898 + RO 976) generó una banda de ~300 pb de longitud. Estas bandas se purificaron y se clonaron en el vector PCR-Blunt como se ha descrito antes. Se encontró que numerosos clones, incluyendo los clones "sdd12-8-12" y "sdd12-9-4" contenían el extremo 3' del gen de la delta-12 desaturasa. Estas secuencias se solapaban con el fragmento de la delta-12 desaturasa inicial e incluían un codón de terminación TAA y una cola poli-A. El análisis de la secuencia con el programa "tFastA" reveló que el clon "sdd12-9-4" compartía un 54,5% de identidad en un solapamiento de 73 aminoácidos con la delta-12 desaturasa de *Mortierella alpina* (Núm. de Acceso AB020033), y un 56,9% de identidad en un solapamiento de 72 aminoácidos con la delta-12 desaturasa de *Mucor rouxii* (Núm. de Acceso AF161219).

Para aislar el extremo 5' de este gen, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos y se utilizaron en combinaciones con el oligonucleótido del vector pBluescript SK(+)RO 899 (SEQ ID NO: 17).

RO 977 (Inverso): 5' - CAA ATG GTA AAA GCT AGT GGC AGC GCT
GC-3' (SEQ ID NO: 37) .

RO 978 (Inverso): 5' -AGT ACG TGC CCT GGA CGA ACC AGT AGA TG-
3' (SEQ ID NO: 38) .

Se llevaron a cabo amplificaciones por PCR utilizando la polimerasa con la marca de fábrica "Taq PCR Master Mix" (Qiagen) o el kit para PCR de ADNc con la marca de fábrica "Advantage-GC" (Clontech). Se utilizó el producto de Clontech para evitar los potenciales problemas de la amplificación por PCR que se pueden producir con las regiones ricas en GC presentes generalmente en el extremo 5' de las desaturasas de este organismo. Las amplificaciones por PCR utilizando la polimerasa con la marca de fábrica "Taq PCR Master Mix" se llevaron a cabo como se ha descrito para el aislamiento del extremo 3' de este gen.

Cuando se utilizó el kit con la marca de fábrica "Advantage-GC cDNA PCR", las condiciones de termociclación fueron las siguientes: el molde se desnaturalizó inicialmente a 94°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 3 minutos, y finalmente un ciclo de prolongación a 68°C durante 5 min. Cada reacción incluyó 1 μ l de molde de la genoteca de ADNc (del Ejemplo 1), 10 pmoles de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, 1M GC Melt, Tricina-KOH 40 mM, KOAc 15 mM, Mg(OAc)₂ 3,5 mM, DMSO al 5%, y 375 μ g/ml de BSA en un volumen total de 50 μ l.

Se obtuvo un producto de la PCR de ~371 pb utilizando la combinación de cebadores (RO 899 + RO 978). Esta banda se clonó en el vector PCR-Blunt (Invitrogen) como se ha descrito antes. Solamente un clon, "sdd12-10-8", obtenido de este modo contenía el supuesto sitio de inicio ATG del gen. Otros clones tenían ATG sustituido con otros codones. El análisis "tFastA" de la secuencia de aminoácidos deducida de "sdd12-10-8" mostró una identidad de 47,2% en un solapamiento de 72 aminoácidos de la delta-12 desaturasa de *Impatiens balsamina* (Núm. de Acceso AF182520) y una identidad de 42,7% en un solapamiento de 75 aminoácidos con la delta-12 desaturasa de *Calendula officinalis* (Núm. de Acceso AJ245938).

La totalidad de esta delta-12 desaturasa se obtuvo mediante amplificación por PCR de la genoteca de ADNc de *S. diclina* del Ejemplo 1 utilizando los siguientes nucleótidos:

RO1051 (Directo): 5'- TCA ACA GAA TTC ATG TGC AAA GGT CAA GCT CCT TCC AAG GCC GAC GTG -3' (SEQ ID 39). Este cebador contiene el sitio de inicio "ATG" (subrayado) seguido de la secuencia 5' de la Delta 12 desaturasa. Además, se introdujo un sitio *EcoRI* (doble subrayado) aguas arriba del sitio de inicio para facilitar la clonación en el vector de expresión de levadura pYX242.

RO1057 (Inverso): 5'- AAA AGA AAG CTT TTA CTT TTC CTC GAG CTT GCG CTT GTA AAA CAC AAC-3' (SEQ ID NO: 40). Este cebador contiene el codón de terminación TAA (subrayado) del gen así como un sitio *HindIII* (doble subrayado), que se incluyó para la clonación conveniente en el vector de expresión de levadura pYX242.

ES 2 310 652 T3

La amplificación mediante PCR se llevó a cabo utilizando la polimerasa con la marca de fábrica “Taq PCR Master Mix” (Qiagen) y el kit con la marca de fábrica “Advantage-GC cDNA PCR” (Clontech), como se ha descrito antes. En este caso, sin embargo, se utilizó el ADN genómico de *S. diclina* como molde para la amplificación. Se este modo se obtuvo una banda de PCR de ~1,1 kb y esta banda se aisló, se purificó, se clonó en el vector PCR-Blunt (Invitrogen), y se transformó en células TOP10. Los insertos se secuenciaron para verificar la secuencia génica. El clon “sdd12-gg-b1” se digirió con *EcoRI/HindIII* para liberar el inserto completo, y este inserto se clonó en el vector de expresión de levadura pYX242, digerido previamente con *EcoRI/HindIII*. Este constructo incluía 1182 pb del gen de la delta-12 desaturasa y pYX242. El constructo se etiquetó como pRSP11. El constructo pRSP11 se transformó después en *S. cerevisiae* (SC334) para los estudios de expresión.

El gen completo de esta supuesta delta-12 desaturasa (etiquetada como *sdd12*) tenía 1182 pb de longitud (SEQ ID NO: 41) (Figura 6). El gen codifica una proteína de 393 restos aminoácido (SEQ ID NO: 42) (Figura 7). Una búsqueda “tFastA” de la secuencia de proteína deducida de *sdd12* mostró que la proteína tenía la máxima identidad (45,6% en un solapamiento de 379 aminoácidos) con la delta-12 desaturasa de *Gossypium hirsutum* (Núm. de Acceso X97016) (Figura 8) y una identidad de 49,6% en un solapamiento de 353 aminoácidos con la delta-12 desaturasa de *Sesamum indicum* (FAD2) (Núm. de Acceso AF192486).

Como otras delta-12 desaturasas, esta enzima tampoco contiene un dominio citocromo b5 en el extremo 5' de su secuencia. Esta enzima contiene tres secuencias ricas en histidina que están presentes en todas las desaturasas unidas a la membrana. La posición y la longitud de estas cajas de histidina son similares a las observadas en otras desaturasas. Estas se encuentran presentes en las posiciones de los aminoácidos 108 a 112 (HECGH), 144 a 148 (HRRHH), y 326 a 330 (HVTHH) del SEQ ID NO: 42. Como se ha observado antes, se cree que estas cajas ricas en histidina coordinan la estructura dihierro-oxo del sitio activo de la enzima y son necesarias para la actividad enzimática.

Ejemplo 9

Expresión del Gen de la Delta 12-Desaturasa (sdd12) en Levadura Panadera

Para determinar la especificidad de sustrato y la clase de reacción catalizada por esta delta-12 desaturasa (SDD12), se expresó heterológamente *sdd12* en *Saccharomyces cerevisiae* (SC334). Como se ha observado antes, debido a que *S. cerevisiae* no puede sintetizar ácidos grasos más allá de OA, éste resulta un sistema ideal para determinar la actividad enzimática sobre sustratos más largos que OA ya que no se detectará actividad enzimática de fondo. Los ácidos grasos sustrato adecuados son suministrados exógenamente al anfitrión; estos sustratos son absorbidos por la célula y atacados o por la delta-12 desaturasa expresada del gen *sdd12* transformado.

El clon pRSP11, que contenía la delta-12 desaturasa completa (*sdd12*) de *S. diclina*, clonado en pYX242, se transformó en *Saccharomyces cerevisiae* (SC334) utilizando el kit con la marca de fábrica “Alkali-Cation Yeast Transformation” (BIO 101), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los transformantes fueron seleccionados en cuanto a la auxotrofia para la leucina sobre medio que carecía de leucina (DOB-Leu). Para detectar la actividad desaturasa específica de estos clones, se hicieron crecer los transformantes en presencia de 50 μ M de cada uno de OA, LA, GLA, y DGLA.

La conversión de OA en LA (18:2n-6) indica actividad delta-12 desaturasa.

La conversión de LA en ALA (18:3n-3) indica actividad delta-15 desaturasa.

La conversión de LA en GLA (18:3n-6) indica actividad delta-6 desaturasa.

La conversión de GLA en ácido estearidónico (18:4n-3) indica actividad delta-15 desaturasa.

La conversión de DGLA en ETA (20:4n-3) indica actividad delta-17 desaturasa.

La conversión de DGLA en AA (20:4n-6) indica actividad delta-5 desaturasa.

La cepa de control negativo fue *S. cerevisiae* transformada con el vector pYX242. Los cultivos experimentales y de control se hicieron crecer simultáneamente y se analizaron.

Los cultivos se agitaron vigorosamente (250 rpm) y se hicieron crecer durante 48 horas a 24°C en presencia de 50 μ M (concentración final) de los diversos sustratos (véase la Tabla 7). Las células se centrifugaron, se lavaron una vez en agua destilada, y los sedimentos se resuspendieron en metanol; se añadió cloroformo junto con tritridecanoína (como patrón interno). Estas mezclas se incubaron durante al menos una hora a la temperatura ambiente, o a 4°C durante la noche. La capa de cloroformo se extrajo y se filtró a través de un filtro Whatman con 1 g de sulfato de sodio anhidro para separar el material particulado y el agua residual. Los disolventes orgánicos se evaporaron a 40°C en una corriente de nitrógeno. Los lípidos extraídos se convirtieron después en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para el análisis mediante cromatografía de gases (GC) añadiendo 2 ml de hidróxido de potasio en metanol 0,5 N a un tubo cerrado. Las muestras se calentaron a 95°C-100°C durante 30 minutos y se enfriaron a la temperatura ambiente. Se añadieron aproximadamente 2 ml de trifluoruro de boro en metanol al 14% y se repitió el calentamiento. Una vez

ES 2 310 652 T3

que la mezcla de lípidos extraída se hubo enfriado, se añadieron al extracto 2 ml de agua y 1 ml de hexano para extraer los FAME para el análisis mediante GC. El porcentaje de conversión se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Conversión} = \frac{[\% \text{ Producto}]}{[\% \text{ Producto} + \% \text{ Sustrato}]} \times 100$$

La Tabla 7 muestra la actividad enzimática de la delta-12 desaturasa cuando es expresada en levadura. Aquí, cuando el clon pRSP11 era expresado era capaz de convertir 35,8% de OA sustrato en LA, indicando actividad delta-12 desaturasa.

En la Tabla 7, los ácidos grasos de interés están representados como el porcentaje de lípidos totales extraídos de levadura. Se empleó GC/MS para identificar los productos. En estas condiciones, los clones no mostraban otras actividades desaturasa. Esto confirmó que el gen aislado es un gen de delta-12 desaturasa. No se detectó conversión del sustrato de fondo utilizando los anfitriones transformados sólo con el vector. Estos datos indican que esta delta-12 desaturasa puede ser expresada en un sistema heterólogo y de este modo es útil en la producción de ácidos grasos poliinsaturados transgénicos como GLA, AA, EPA y DHA.

TABLA 7

Expresión de Delta 12-Desaturasa de <i>Saprolegnia diclina</i> en Levadura Panadera a 24°C				
Clon	Actividad Desaturasa	Sustrato* Incorporado	Producto Formado	% Conversión de Sustrato
pRSP11	Delta 12	OA (17,09%)	LA (9,59%)	35,8%
(pYX242 +	Delta 15	LA (18,14%)	ALA (0,06%)	0
Delta 12-	Delta 6	LA (18,14%)	GLA (0%)	0
Desaturasa	Delta 5	DGLA (25,38%)	AA (0,17 %)	0
(<i>S. diclina</i>)	Delta 17	DGLA (25,38%)	ETA (0,07%)	0
Control	Delta 12	OA (18,99%)	LA (0,09%)	0
(pYX242)	Delta 15	LA (8,63%)	ALA (0%)	0
	Delta 6	LA (8,63%)	GLA (0%)	0
	Delta 5	DGLA (13,74%)	AA (0%)	0
	Delta 17	DGLA (13,74%)	ETA (0%)	0
*Sustrato utilizado 50 µM				
Los números entre paréntesis representan los ácido grasos como porcentaje de lípidos totales de levadura				

Composiciones Nutricionales

Los PUFA descritos en la Descripción Detallada se pueden utilizar en diversos suplementos nutricionales, formulaciones para lactantes, sustitutos nutricionales y otras soluciones nutricionales.

I. Formulaciones para lactantes

A. Fórmula Isomil® Soja con Hierro

Uso: Como bebida para lactantes, niños y adultos con alergia o sensibilidad a la leche de vaca. Un alimento para pacientes con trastornos en los cuales debe ser evitada la lactosa: deficiencia de lactasa, intolerancia a la lactosa y galactosemia.

ES 2 310 652 T3

Características

- Producto aislado de proteína de soja para evitar los síntomas de la alergia o sensibilidad a la proteína de leche de vaca.
- Formulación sin lactosa para evitar la diarrea asociada a la lactosa.
- Baja osmolalidad (240 mOs/kg agua) para reducir el riesgo de diarrea osmótica.
- Carbohidratos duales (jarabe de maíz y sacarosa) diseñados para potenciar la absorción de carbohidratos y reducir el riesgo de exceder la capacidad absorbente del intestino dañado.
- 1,8 mg de Hierro (en forma de sulfato ferroso) por 100 Calorías para ayudar a prevenir la deficiencia de hierro.
- Niveles recomendados de vitaminas y minerales.
- Aceites vegetales para proporcionar los niveles recomendados de ácidos grasos esenciales.
- Color blanco leche, consistencia como la leche y aroma agradable.

Ingredientes: (Pareve) 85% de agua, 4,9% de jarabe de maíz, 2,6% de azúcar (sacarosa), 2,1% de aceite de soja, 1,9% de producto aislado de proteína de soja, 1,40 aceite de coco, 0,15% de citrato de calcio, 0,11% de fosfato de calcio tribásico, citrato de potasio, fosfato de potasio monobásico, cloruro de potasio, mono- y diglicéridos, lecitina de soja, carragenano, ácido ascórbico, L-metionina, cloruro de magnesio, fosfato de potasio dibásico, cloruro de sodio, cloruro de colina, taurina, sulfato ferroso, m-inositol, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, L-carnitina, niacinamida, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, hidrocloreto de cloruro de tiamina, riboflavina, hidrocloreto de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

B. Fórmula Isomil® DF Soja Para Diarrea

Uso: Como alimento a corto plazo para el tratamiento dietético de la diarrea en lactantes y párvulos.

Características

- Primera fórmula para lactantes que contiene fibra dietética añadida de fibra de soja específicamente para el tratamiento de la diarrea.
- Demostrado clínicamente que reduce la duración de las deposiciones sueltas, acuosas durante la diarrea suave a grave en lactantes.
- Nutricionalmente completo para satisfacer las necesidades nutricionales del lactante.
- Producto aislado de proteína de soja con L-metionina añadida satisface o supera el requerimiento del lactante para todos los aminoácidos esenciales.
- Formulación sin lactosa para evitar la diarrea asociada a la lactosa.
- Baja osmolalidad (240 mOsm/kg agua) para reducir el riesgo de diarrea osmótica.
- Carbohidratos duales (jarabe de maíz y sacarosa) diseñados para potenciar la absorción de carbohidratos y reducir el riesgo de exceder la capacidad absorbente del intestino dañado.
- Satisface o supera los niveles de vitamina y minerales recomendados por el Comité de Nutrición de la Academia de Pediatría Americana y requeridos por el Acta de Fórmulas para Lactantes.
- 1,8 mg de hierro (en forma de sulfato ferroso) por 100 Calorías para ayudar a evitar la deficiencia de hierro.
- Aceites vegetales para proporcionar los niveles recomendados de ácidos grasos esenciales.

Ingredientes: (Pareve) 86% de agua, 4,8% de jarabe de maíz, 2,5% de azúcar (sacarosa), 2,1% de aceite de soja, 2,0% de producto aislado de proteína de soja, 1,4% de aceite de coco, 0,77% de fibra de soja, 0,12% de citrato de calcio, 0,11% de fosfato de calcio tribásico, 0,10% de citrato de potasio, cloruro de potasio, fosfato de potasio monobásico, mono y diglicéridos, lecitina de soja, carragenano, cloruro de magnesio, ácido ascórbico, L-metionina, fosfato de potasio dibásico, cloruro de sodio, cloruro de colina, taurina, sulfato ferroso, m-inositol, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, L-carnitina, niacinamida, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A,

ES 2 310 652 T3

hidrocloruro de cloruro de tiamina, riboflavina, hidrocloruro de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

5 C. Fórmula Isomil® SF de Soja Sin Sacarosa Con Hierro

Uso: En forma de bebida para lactantes, niños y adultos con alergia o sensibilidad a la proteína de leche de vaca o intolerancia a la sacarosa. Un alimento para pacientes con trastornos en los cuales deben ser evitadas la lactosa y la sacarosa.

10

Características

- Producto aislado de proteína de soja para evitar síntomas de alergia o sensibilidad a la proteína de leche de vaca.
- Formulación sin lactosa para evitar la diarrea asociada a la lactosa (la fuente de carbohidrato son Polímeros de Glucosa Polycose®).
- Sin sacarosa para pacientes que no toleran la sacarosa.
- Baja osmolalidad (180 mOsm/kg agua) para reducir el riesgo de diarrea osmótica.
- 1,8 mg de hierro (en forma de sulfato ferroso) por 100 Calorías para ayudar a evitar la deficiencia de hierro.
- Niveles recomendados de vitaminas y minerales.
- Aceites vegetales para proporcionar los niveles recomendados de ácidos grasos esenciales.
- Color blanco leche, consistencia similar a la leche y aroma agradable.

30

Ingredientes: (Pareve) 75% de agua, 11,8% de almidón de maíz hidrolizado, 4,1% de aceite de soja, 4,1% de producto aislado de proteína de soja, 2,8% de aceite de coco, 1,0% de almidón de maíz modificado, 0,38% de fosfato de calcio tribásico, 0,17% de citrato de potasio, 0,13% de cloruro de potasio, mono- y diglicéridos, lecitina de soja, cloruro de magnesio, ácido ascórbico, L-metionina, carbonato de calcio, cloruro de sodio, cloruro de colina, carragenano, taurina, sulfato ferroso, m-inositol, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, L-carnitina, niacinamida, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, hidrocloruro de cloruro de tiamina, riboflavina, hidrocloruro de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

35

40

D. Fórmula Isomil® 20 de Soja Con Hierro Lista Para Tomar, 20 Cal/30 ml.

Uso: Cuando se desea un alimento de soja.

45

Ingredientes: (Pareve) 85% de agua, 4,9% de jarabe de maíz, 2,6% de azúcar (sacarosa), 2,1% de aceite de soja, 1,9% de producto aislado de proteína de soja, 1,4% de aceite de coco, 0,15% de citrato de calcio, 0,11% de fosfato de calcio tribásico, citrato de potasio, fosfato de potasio monobásico, cloruro de potasio, mono- y diglicéridos, lecitina de soja, carragenano, ácido ascórbico, L-metionina, cloruro de magnesio, fosfato de potasio dibásico, cloruro de sodio, cloruro de colina, taurina, sulfato ferroso, m-inositol, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, L-carnitina, niacinamida, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, hidrocloruro de cloruro de tiamina, riboflavina, hidrocloruro de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

50

55

E. Fórmula para Lactantes Similac®

Uso: Cuando se necesita una fórmula para lactantes: si la decisión se toma para interrumpir la lactancia materna antes de 1 año de edad, si se necesita un suplemento para la lactancia materna o como alimentación rutinaria si no se adopta la lactancia materna.

60

Características

- Proteína de calidad y cantidad apropiada para un buen crecimiento; desnaturalizada con calor, que reduce el riesgo de la pérdida de sangre entérica asociada a la leche.
- Grasa de una combinación de aceites vegetales (doblemente homogeneizados), que proporciona ácido linoleico esencial que es fácilmente absorbido.

65

ES 2 310 652 T3

- Carbohidrato en forma de lactosa en una proporción similar a la de la leche humana.
- Baja carga de soluto renal para minimizar el estrés sobre los órganos en desarrollo.
- Formas en Polvo, Líquido Concentrado y Listas para Tomar.

Ingredientes: (-D) agua, leche desnatada, lactosa, aceite de soja, aceite de coco, mono- y diglicéridos, lecitina de soja, ácido ascórbico, carragenano, cloruro de colina, taurina, m-inositol, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, niacinamida, sulfato ferroso, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, palmitato de vitamina A, hidrocloreuro de cloruro de tiamina, riboflavina, hidrocloreuro de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

F. Fórmula para Lactantes Prematuros Similac® NeoCare con Hierro

Uso: Para las necesidades nutricionales especiales de los lactantes prematuros tras la salida del hospital. Similac NeoCare es una fórmula nutricionalmente completa desarrollada para proporcionar calorías extra, proteínas, vitaminas y minerales a los lactantes prematuros que necesitan promover la ganancia de peso y un apoyo para el crecimiento.

Características

- Reduce la necesidad de suplemento calórico y de vitaminas. Más calorías (22 Cal/30 ml) que las fórmulas a término normalizadas (20 Cal/30 ml).
- Combinación grasa altamente absorbida, con triglicéridos de cadena media (MCToil) para ayudar a satisfacer las necesidades digestivas especiales de los lactantes prematuros.
- Niveles superiores de proteína, vitaminas y minerales por 100 calorías para prolongar el apoyo nutricional iniciado en el hospital.
- Más calcio y fósforo para una mejor mineralización ósea.

Ingredientes: -D Sólidos de jarabe de maíz, leche desnatada, lactosa, producto concentrado de proteína de suero, aceite de soja, aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico, aceite de coco fraccionado (triglicéridos de cadena media), aceite de coco, citrato de potasio, fosfato de calcio tribásico, carbonato de calcio, ácido ascórbico, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, taurina, sulfato ferroso, m-inositol, cloruro de colina, palmitato de ascorbilo, L-carnitina, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de cinc, niacinamida, tocoferoles mixtos, citrato de sodio, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, hidrocloreuro de cloruro de tiamina, palmitato de vitamina A, beta- caroteno, riboflavina, hidrocloreuro de piridoxina, ácido fólico, sulfato de manganeso, filoquinona, biotina, selenito de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina.

G. Reforzante de Leche Humana Similac Natural Care con Bajo contenido de Hierro Listo para su Uso, 24 Cal/30 ml.

Uso: Diseñado para ser mezclado con leche humana o para alimentar alternativamente con leche humana a lactantes nacidos con poco peso.

Ingredientes: -D Agua, leche desnatada, almidón de maíz hidrolizado, lactosa, aceite de coco fraccionado (triglicéridos de cadena media), producto concentrado de proteína de suero, aceite de soja, aceite de coco, fosfato de calcio tribásico, citrato de potasio, cloruro de magnesio, citrato de sodio, ácido ascórbico, carbonato de calcio, mono y diglicéridos, lecitina de soja, carragenano, cloruro de colina, m-inositol, taurina, niacinamida, L-carnitina, acetato de alfa-tocoferilo; sulfato de cinc, cloruro de potasio, pantotenato de calcio, sulfato ferroso, sulfato cúprico, riboflavina, palmitato de vitamina A, hidrocloreuro de cloruro de tiamina, hidrocloreuro de piridoxina, biotina, ácido fólico, sulfato de manganeso, filoquinona, vitamina D3, selenito de sodio y cianocobalamina.

Diversos PUFA de esta invención pueden ser sustituidos y/o añadidos a las fórmulas para lactantes descritas antes y a otras fórmulas para lactantes conocidas por los expertos en la técnica.

II. Formulaciones nutricionales

A. ENSURE®

Uso: ENSURE es un alimento líquido con pocos residuos diseñado principalmente como suplemento nutricional oral para ser utilizado con o entre comidas, o, en cantidades apropiadas, como sustituto de las comidas. ENSURE no tiene lactosa ni gluten, y es adecuado para su uso en dietas modificadas, incluyendo las dietas con bajo contenido de colesterol. Aunque es principalmente un suplemento oral, puede ser alimentado mediante intubación.

ES 2 310 652 T3

Condiciones del Paciente

- Para pacientes con dietas modificadas.
- Para pacientes ancianos con riesgo por nutrición.
- Para pacientes con pérdida de peso involuntaria.
- Para pacientes que se recuperan de una enfermedad o intervención quirúrgica.
- Para pacientes que necesitan una dieta con pocos residuos.

Ingredientes: -D Agua, Azúcar (Sacarosa), Maltodextrina (Maíz), Caseinatos de Calcio y Sodio, Aceite de Cártamo con Alto Contenido de Ácido Oleico, Producto Aislado de Proteína de Soja, Aceite de Soja, Aceite de Canola, Citrato de Potasio, Fosfato de Calcio Tribásico, Citrato de sodio, Cloruro de Magnesio, Fosfato de Magnesio Dibásico, Aroma Artificial, Cloruro de Sodio, Lecitina de Soja, Cloruro de Colina, Ácido Ascórbico, Carragenano, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Goma Gelán, Niacinamida, Pantotenato de Calcio, Sulfato de manganeso, Sulfato Cúprico, Palmitato de Vitamina A, Hidrocloruro de cloruro de tiamina, Hidrocloruro de piridoxina, Riboflavina, Ácido fólico, Molibdato de Sodio, Cloruro de Cromo, Biotina, Yoduro de potasio, Selenato de Sodio.

B. ENSURE® BARRAS

Uso: ENSURE BARRAS son una nutrición completa, equilibrada para su uso suplementario entre o con las comidas. Proporcionan una alternativa rica en nutrientes, deliciosa a otros aperitivos. ENSURE BARRAS contiene <1 g lactosa/barra, y el aroma para “brownies” con dulce de leche y chocolate (“Chocolate Fudge Brownie”) carece de gluten. (El aroma Honey Graham Crunch contiene gluten).

Condiciones del Paciente

- Para pacientes que necesitan calorías, proteínas, vitaminas y minerales extra.
- Especialmente útiles para gente que no ingiere suficientes calorías y nutrientes.
- Para gente que tiene la capacidad de masticar y tragar.
- No debe ser utilizado por nadie con alergia al cacahuete y cualquier tipo de alergia a las nueces.

Ingredientes: Honey Graham Crunch -- Jarabe de Maíz con Alto Contenido de Fructosa, Producto Aislado de Soja, Azúcar Moreno, Miel, Maltodextrina (Maíz), Arroz Quebradizo (Arroz Molido, Azúcar [Sacarosa], Sal [Cloruro de Sodio] y Malta), Salvado de Avena, Aceites de semilla de Algodón y Soja parcialmente Hidrogenados, Polisacárido de Soja, Glicerina, Producto concentrado de Proteína de Suero, Polidextrosa, Fructosa, Caseinato de Calcio, Polvo de Cacao, Aromas Artificiales, Aceite de Canola, Aceite de Cártamo con Alto Contenido de ácido Oleico, Leche en Polvo no Grasa, Polvo de Suero, Lecitina de Soja y Aceite de Maíz. Fabricado en instalaciones de tratamiento de nueces.

Vitaminas y Minerales: Fosfato de Calcio Tribásico, Fosfato de Potasio Dibásico, Oxido de Magnesio, Sal (Cloruro de Sodio), Cloruro de Potasio, Ácido Ascórbico, Ortofosfato Férrico, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Niacinamida, Oxido de Cinc, Pantotenato de Calcio, Gluconato de Cobre, Sulfato de Manganeso, Riboflavina, Beta Caroteno, Hidrocloruro de Piridoxina, Mononitrato de Tiamina, Ácido Fólico, Biotina, Cloruro de Cromo, Yoduro de Potasio, Selenato de Sodio, Molibdato de Sodio, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

Proteína: Honey Graham Crunch - La fuente de proteína es una combinación de producto aislado de proteína de soja y proteínas de la leche.

Producto aislado de proteína de soja	74%
Proteínas de la leche	26%

Grasa: Honey Graham Crunch - La fuente de grasa es una combinación de aceites de semilla de algodón y soja, canola, cártamo con alto contenido de ácido oleico, aceites y lecitina de soja.

Aceite de semilla de algodón y de soja parcialmente hidrogenados 76%.

ES 2 310 652 T3

5	Aceite de Canola	8%
	Aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico	8%
	Aceite de Maíz	4%
10	Lecitina de Soja	4%

15 Carbohidrato: Honey Graham Crunch - La fuente de carbohidrato es una combinación de jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, azúcar moreno, maltodextrina, miel, arroz crujiente, glicerina, polisacárido de soja, y salvado de avena.

20	Jarabe de maíz con alto contenido de fructosa	24%
	Azúcar Moreno	21%
	Maltodextrina	12%
25	Miel	11%
	Arroz Crujiente	9%
30	Glicerina	9%
	Polisacárido de Soja	7%
35	Salvado de Avena	7%

C. ENSURE® HIGH PROTEIN

40 Uso: ENSURE HIGH PROTEIN es un alimento líquido con elevado contenido de proteína, concentrado para gente que requiere calorías, proteínas, vitaminas, y minerales adicionales en sus dietas. Se puede utilizar como suplemento nutricional oral con o entre comidas o, en cantidades apropiadas, como sustituto de las comidas. ENSURE HIGH PROTEIN carece de lactosa y gluten, y es adecuado para su uso por gente que se está recuperando de cirugía general o fracturas de cadera y por pacientes con riesgo de úlceras por presión.

Condiciones del Paciente

- 50 • Para pacientes que requieren calorías, proteínas, vitaminas, y minerales adicionales, tales como pacientes que se están recuperando de cirugía general o fracturas de cadera, pacientes con riesgo de úlceras por presión, y pacientes con dietas con bajo contenido de colesterol.

Características

- 55 • Bajo contenido de grasa saturada.
- Contiene 6 g de grasa total y < 5 mg de colesterol por porción.
- Gusto cremoso, rico.
- 60 • Excelente fuente de proteínas, calcio, y otras vitaminas y minerales esenciales.
- Para dietas con un bajo contenido de colesterol.
- 65 • Sin Lactosa, fácilmente digerible.

ES 2 310 652 T3

Ingredientes

Vainilla Suprema: -D Agua, Azúcar (Sacarosa), Maltodextrina (Maíz), Caseinatos de Calcio y Sodio, Aceite de Cártamo con al contenido de Ácido Oleico, Producto Aislado de Proteína de Soja, Aceite de Soja, Aceite de Canola, Citrato de Potasio, Fosfato de Calcio Tribásico, Citrato de Sodio, Cloruro de Magnesio, Fosfato de Magnesio Dibásico, Aroma Artificial, Cloruro de Sodio, Lecitina de Soja, Cloruro de Colina, Ácido Ascórbico, Carragenano, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Goma Gelan, Niacinamida, Pantotenato de Calcio, Sulfato de Manganeso, Sulfato Cúprico, Palmitato de Vitamina A, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Hidrocloruro de Piridoxina, Riboflavina, Ácido Fólico, Molibdato de Sodio, Cloruro de Cromo, Biotina, Yoduro de Potasio, Selenato de Sodio, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

Proteína

La fuente de proteína es una combinación de dos proteínas de alto valor biológico: caseína y soja.

Caseinatos de Sodio y calcio	85%
Producto aislado de Proteína de Soja	15%

Grasa

La fuente de grasa es una combinación de tres aceites: aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico, canola y soja.

Aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico	40%
Aceite de Canola	30%
Aceite de Soja	30%

El nivel de grasa de ENSURE HIGH PROTEIN satisface las pautas de la Asociación Americana del Corazón (AHA). Los 6 gramos de grasa de ENSURE HIGH PROTEIN representan el 24% de las calorías totales, siendo un 2,6% de la grasa de ácidos saturados y un 7,9% de ácidos grasos poliinsaturados. Estos valores están dentro de las pautas de la AHA de < 30% de calorías totales de grasa, < 10% de calorías totales de ácidos grasos saturados, y < 10% de calorías totales de ácidos grasos poliinsaturados.

Carbohidratos

ENSURE HIGH PROTEIN contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El suave dulzor y la variedad de sabores (vainilla suprema, chocolate royal, bayas silvestres, y banana), más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pecan, cereza, fresa, limón, y naranja, ayudan a evitar el cansancio del sabor y contribuyen a la conformidad del paciente.

Vainilla y otros sabores distintos de chocolate

Sacarosa	60%
Maltodextrina	40%

Chocolate

Sacarosa	70%
Maltodextrina	30%

ES 2 310 652 T3

D. ENSURE® LIGHT

Uso: ENSURE LIGHT es un alimento líquido con bajo contenido de grasa diseñado para su uso como suplemento nutricional oral con o entre comidas. ENSURE LIGHT carece de lactosa y gluten, y es adecuado para su uso en dietas modificadas, incluyendo dietas con bajo contenido de colesterol.

Condiciones del Paciente

- Para pacientes con un peso normal o con sobrepeso que necesitan una nutrición extra en un suplemento que contiene 50% menos de grasa y 20% menos calorías que ENSURE.
- Para adultos sanos que no comen bien y necesitan una nutrición extra.

Características

- Bajo contenido de grasa y grasa saturada.
- Contiene 3 g de grasa total por ración y < 5 mg de colesterol.
- Sabor cremoso, rico.
- Excelente fuente de calcio y otras vitaminas y minerales esenciales.
- Para dietas con un bajo contenido de colesterol.
- Sin lactosa, fácilmente digerido.

Ingredientes

Vainilla Francesa: -D Agua, Maltodextrina (Maíz), Azúcar (Sacarosa), Caseinato de Calcio, Aceite de Cártamo con Alto Contenido de ácido Oleico, Aceite de Canola, Cloruro de Magnesio, Citrato de Sodio, Citrato de Potasio, Fosfato de Potasio Dibásico, Fosfato de Magnesio Dibásico, Natural y Aroma Artificial, Fosfato de Calcio Tribásico, Gel de Celulosa, Cloruro de Colina, Lecitina de Soja, Carragenano, Sal (Cloruro de Sodio), Ácido Ascórbico, Goma de Celulosa, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Sulfato de Cinc, Niacinamida, Sulfato de Manganeso, Pantotenato de Calcio, Sulfato Cúprico, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Palmitato de Vitamina A, Hidrocloruro de Piridoxina, Riboflavina, Cloruro de Cromo, Ácido Fólico, Molibdato de Sodio, Biotina, Yoduro de Potasio, Selenato de Sodio, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

Proteína

La fuente de proteína es caseinato de calcio.

Caseinato de calcio	100%
---------------------	------

Grasa

La fuente de grasa es una combinación de dos aceites: cártamo con alto contenido de ácido oleico y canola.

Aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico	70%
Aceite de canola	30%

El nivel de grasa de ENSURE LIGHT satisface las pautas de la Asociación Americana del Corazón (AHA). Los 3 gramos de grasa de ENSURE LIGHT representan un 13,5% de las calorías totales, siendo 1,4% de la grasa de ácidos grasos saturados y 2,6% de ácidos grasos poliinsaturados. Estos valores están dentro de las pautas de la AHA de < 30% de las calorías totales de grasa, < 10% de las calorías de ácidos grasos saturados, y < 10% de las calorías totales de ácidos grasos poliinsaturados.

ES 2 310 652 T3

Carbohidratos

ENSURE LIGHT contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El sabor a chocolate contiene también jarabe de maíz. El suave dulzor y la variedad de sabores (Vainilla Francesa, chocolate supremo, veteado de fresa), más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pecán, cereza, fresa, limón, y naranja, ayudan a evitar el cansancio del sabor y contribuyen a la conformidad del paciente.

Vainilla y otros aromas distintos de chocolate

Sacarosa	51%
Maltodextrina	49%

Chocolate

Sacarosa	47,0%
Jarabe de Maíz	26,5%
Maltodextrina	26,5%

Vitaminas y Minerales

Una porción de 2,3 dL de ENSURE LIGHT proporciona al menos un 25% de RDI (Ingesta Diaria de Referencia) para 24 vitaminas y minerales clave.

Cafeína

El sabor a chocolate contiene 2,1 mg de cafeína/2,3 dL.

E. ENSURE PLUS®

Uso: ENSURE PLUS es un alimento líquido con pocos residuos, alto contenido de calorías para su uso cuando se necesitan calorías y nutrientes extra, pero una concentración normal de proteína. Está diseñado principalmente como suplemento nutricional oral para ser utilizado con o entre comidas o, en cantidades apropiadas, como sustituto de una comida. ENSURE PLUS carece de lactosa y gluten. Aunque es principalmente un suplemento nutricional oral, puede ser alimentado mediante intubación.

Condiciones del Paciente

- Para pacientes que requieren calorías y nutrientes extra, pero una concentración normal de proteína, en un volumen limitado.
- Para pacientes que necesitan ganar o mantener un peso saludable.

Características

- Sabor cremoso, rico.
- Buena fuente de vitaminas y minerales esenciales.

Ingredientes

Vainilla: -D Agua, Jarabe de Maíz, Maltodextrina (Maíz), Aceite de Maíz, Caseinatos de Sodio y Calcio, Azúcar (Sacarosa), Producto Aislado de Proteína de Soja, Cloruro de Magnesio, Citrato de Potasio, Fosfato de Calcio Tri-básico, Lecitina de Soja, Natural y Aroma Artificial, Citrato de Sodio, Cloruro de Potasio, Cloruro de Colina, Ácido Ascórbico, Carragenano, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Niacinamida, Pantotenato de Calcio, Sulfato de Manganeso, Sulfato Cúprico, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Hidrocloruro de Piridoxina, Ri-

ES 2 310 652 T3

boflavina, Palmitato de Vitamina A, Ácido Fólico, Biotina, Cloruro de Cromo, Molibdato de Sodio, Yoduro de Potasio, Selenito de Sodio, Filoquinona, Cianocobalamina y Vitamina D3.

Proteína

5

La fuente de proteína es una combinación de dos proteínas de elevado valor biológico: caseína y soja.

10

Caseinatos de Sodio y calcio	84%
Producto aislado de proteína de soja	16%

15

Grasa

La fuente de grasa es aceite de maíz.

20

Aceite de Maíz	100%
----------------	------

25

Carbohidrato

ENSURE PLUS contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El suave dulzor y la variedad de sabores (vainilla, chocolate, fresa, café, manteca de pecán, y ponche de huevo), más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pecán, cereza, fresa, limón, y naranja ayudan a evitar el cansancio del sabor y contribuyen a la conformidad del paciente.

30

Sabores de Vainilla, fresa, manteca de pecán, y café

35

Jarabe de Maíz	39%
Maltodextrina	38%
Sacarosa	23%

40

Sabores de chocolate y ponche de huevo

45

Jarabe de Maíz	36%
Maltodextrina	34%
Sacarosa	30%

50

Vitaminas y Minerales

55

Una porción de 2,3 dL de ENSURE PLUS proporciona al menos un 15% de la RDI para 25 vitaminas y minerales clave.

Cafeína

60

El sabor de chocolate contiene 3,1 mg de cafeína/2,3 dL. El sabor de café contiene una cantidad vestigial de cafeína.

65

F. ENSURE PLUS® HN

Uso: ENSURE PLUS HN es un alimento líquido con alto contenido de nitrógeno, muy calórico nutricionalmente completo diseñado para gente con necesidades superiores de calorías y proteínas o con una tolerancia limitada al

ES 2 310 652 T3

volumen. Se puede utilizar como suplemento oral o para un soporte nutricional total mediante intubación. ENSURE PLUS HN carece de lactosa y de gluten.

Condiciones del Paciente

- Para pacientes con un incremento en las necesidades de calorías y proteínas, por ejemplo después de cirugía o lesión.
- Para pacientes con tolerancia limitada al volumen y pronta saciedad.

Características

- Para nutrición suplementaria o total.
- Para alimentación oral o mediante intubación.
- 1,5 CaV/mL,
- Elevado contenido de nitrógeno.
- Denso calorimétricamente.

Ingredientes

Vainilla: -D Agua, Maltodextrina (Maíz), Caseinatos de Sodio y Calcio, Aceite de Maíz, Azúcar (Sacarosa), Producto Aislado de Proteína de Soja, Cloruro de Magnesio, Citrato de Potasio, Fosfato de Calcio Tribásico, Lecitina de Soja, Natural y Aroma Artificial, Citrato de Sodio, Cloruro de Colina, Ácido Ascórbico, Taurina, L-Carnitina, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Niacinamida, Carragenano, Pantotenato de Calcio, Sulfato de Manganeso, Sulfato Cúprico, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Hidrocloruro de Piridoxina, Riboflavina, Palmitato de Vitamina A, Ácido Fólico, Biotina, Cloruro de Cromo, Molibdato de Sodio, Yoduro de Potasio, Selenito de Sodio, Filoquinona, Cianocobalamina y Vitamina D3.

G. ENSURE® POWDER

Uso: ENSURE POWDER (reconstituido con agua) es un alimento líquido con bajo contenido de residuos diseñado principalmente como suplemento nutricional oral que se va a utilizar con o entre comidas. ENSURE POWDER carece de lactosa y gluten, y es adecuado para su uso en dietas modificadas, incluyendo dietas con bajo contenido de colesterol.

Condiciones del Paciente

- Para pacientes con dietas modificadas.
- Para pacientes ancianos en riesgo por nutrición.
- Para pacientes que se recuperan de una enfermedad/intervención quirúrgica.
- Para pacientes que necesitan una dieta con bajo contenido de residuos.

Características

- Conveniente, fácil de mezclar.
- Con bajo contenido de grasas saturadas.
- Contiene 9 g de grasa total y < 5 mg de colesterol por ración.
- Elevado contenido de vitaminas y minerales.
- Para dietas con bajo contenido de colesterol.
- Sin lactosa, fácilmente digerido.

Ingredientes: -D Jarabe de Maíz, Maltodextrina (Maíz), Azúcar (Sacarosa), Aceite de Maíz, Caseinatos de Sodio y Calcio, Producto Aislado de Proteína de Soja, Aroma Artificial, Citrato de Potasio, Cloruro de Magnesio, Citrato de Sodio, Fosfato de Calcio Tribásico, Cloruro de Potasio, Lecitina de Soja, Ácido Ascórbico, Cloruro de Colina, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Niacinamida, Pantotenato de Calcio, Sulfato de Manganeso,

ES 2 310 652 T3

Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Sulfato Cúprico, Hidrocloruro de Piridoxina, Riboflavina, Palmitato de Vitamina A, Ácido Fólico, Biotina, Molibdato de Sodio, Cloruro de Cromo, Yoduro de Potasio, Selenato de Sodio, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

5 *Proteína*

La fuente de proteína es una combinación de dos proteínas de elevado valor biológico: caseína y soja.

10	Caseinatos de sodio y calcio	84%
	Producto aislado de proteína de soja	16%

15

Grasa

La fuente de grasa es aceite de maíz.

20

	Aceite de maíz	100%
--	----------------	------

25

Carbohidrato

ENSURE POWDER contiene una combinación de jarabe de maíz, maltodextrina, y sacarosa. El suave dulzor de ENSURE POWDER, más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pecán, cereza, fresa, limón, y naranja, ayuda a evitar el cansancio del sabor y contribuye a la conformidad del paciente.

30

Vainilla

35	Jarabe de Maíz	35%
	Maltodextrina	35%
40	Sacarosa	30%

H. ENSURE® PUDDING

45 **Uso:** ENSURE PUDDING es un suplemento denso en nutrientes que proporciona una nutrición equilibrada en forma no líquida que se va a utilizar con o entre comidas. Es apropiado para dietas de consistencia modificada (p. ej., blandas, en puré, o completamente líquidas) o para gente con dificultades para tragar. ENSURE PUDDING carece de gluten.

50 *Condiciones del Paciente*

- Para pacientes con dietas de consistencia modificada (p. ej., blandas, en puré, o completamente líquidas).
- Para pacientes con dificultades para tragar.

55

Características

- Buen sabor, rico y cremoso.
- Buena fuente de vitaminas y minerales esenciales.
- No necesita refrigeración, pero es conveniente.
- Sin gluten.

65

Perfil de Nutrientes por 1,43 dL: Calorías 250, Proteína 10,9%, Grasa Total 34,9%, Carbohidrato 54,2%

ES 2 310 652 T3

Ingredientes

Vainilla: -D Leche no grasa, Agua, Azúcar (Sacarosa), Aceite de Soja Parcialmente Hidrogenado, Almidón Alimentario Modificado, Sulfato de Magnesio, Sal Sódica de Lactilato de Estearoilo, Fosfato de Sodio Dibásico, Aroma Artificial, Ácido Ascórbico, Sulfato de Cinc, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Cloruro de Colina, Niacinamida, Sulfato de Manganeso, Pantotenato de Calcio, FD&C Amarillo núm. 5, Citrato de Potasio, Sulfato Cúprico, Palmitato de Vitamina A, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Hidrocloruro de Piridoxina, Riboflavina, FD&C Amarillo núm. 6, Ácido Fólico, Biotina, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

10 Proteína

La fuente de proteína es leche no grasa.

15	Leche no grasa	100%
----	----------------	------

20 Grasa

La fuente de grasa es aceite de soja hidrogenado.

25	Aceite de soja hidrogenado	100%
----	----------------------------	------

Carbohidrato

30 ENSURE PUDDING contiene una combinación de sacarosa y almidón alimentario modificado. El suave dulzor y la variedad de sabores (vainilla, chocolate, caramelo de mantequilla, y tapioca) ayudan a evitar el cansancio del sabor. El producto contiene 9,2 gramos de lactosa por ración.

35 Vainilla y otros sabores distintos de chocolate

40	Sacarosa	56%
	Lactosa	27%
	Almidón alimentario modificado	17%

45 Chocolate

50	Sacarosa	58%
	Lactosa	26%
55	Almidón alimentario modificado	16%

I. ENSURE® CON FIBRA

60 Uso: ENSURE CON FIBRA es un alimento completamente líquido, nutricionalmente completo, que contiene fibra diseñado para gente que se puede beneficiar de un aumento de fibra dietética y nutrientes. ENSURE CON FIBRA es adecuado para gente que no requiere una dieta con bajo contenido de residuos. Se puede administrar oralmente o mediante intubación, y se puede utilizar como suplemento nutricional de una dieta regular o, en cantidades apropiadas, como sustituto de una comida. ENSURE CON FIBRA carece de lactosa y de gluten, y es adecuado en dietas modificadas, incluyendo las dietas con un bajo contenido de colesterol.

65 Condiciones del Paciente

- Para pacientes que se pueden beneficiar de un aumento de fibra dietética y nutrientes.

ES 2 310 652 T3

Características

- Nueva fórmula avanzada con un bajo contenido de grasa saturada, con un contenido superior de vitaminas y minerales.
- Contiene 6 g de grasa total y < 5 mg de colesterol por ración.
- Sabor cremoso, rico.
- Buena fuente de fibra.
- Excelente fuente de vitaminas y minerales esenciales.
- Para dietas con bajo contenido de colesterol.
- Sin Lactosa ni gluten.

Ingredientes

Vainilla: -D Agua; Maltodextrina (Maíz), Azúcar (Sacarosa), Caseinatos de Sodio y Calcio, Fibra de Avena, Aceite de Cártamo con Alto Contenido de ácido Oleico, Aceite de Canola, Producto Aislado de Proteína de Soja, Aceite de Maíz, Fibra de Soja, Fosfato de Calcio Tribásico, Cloruro de Magnesio, Citrato de Potasio, Gel de Celulosa, Lecitina de Soja, Fosfato de Potasio Dibásico, Citrato de Sodio, Sabores Naturales y Artificiales, Cloruro de Colina, Fosfato de Magnesio, Ácido Ascórbico, Goma de Celulosa, Cloruro de Potasio, Carragenano, Sulfato Ferroso, Acetato de Alfa-Tocoferilo, Sulfato de Cinc, Niacinamida, Sulfato de Manganeso, Pantotenato de Calcio, Sulfato Cúprico, Palmitato de Vitamina A, Hidrocloruro de Cloruro de Tiamina, Hidrocloruro de Piridoxina, Riboflavina, Ácido Fólico, Cloruro de Cromo, Biotina, Molibdato de Sodio, Yoduro de Potasio, Selenato de Sodio, Filoquinona, Vitamina D3 y Cianocobalamina.

Proteína

La fuente de proteína es una combinación de dos proteínas de elevado valor biológico caseína y soja.

Caseinatos de sodio y calcio	80%
Producto aislado de proteína de Soja	20%

Grasa

La fuente de grasa es una combinación de tres aceites: aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico, canola, y maíz.

Aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico	40%
Aceite de canola	40%
Aceite de maíz	20%

El nivel de grasa de ENSURE CON FIBRA satisface las pautas de la Asociación Americana del Corazón (AHA). Los 6 gramos de grasa de ENSURE CON FIBRA representan el 22% de las calorías totales, siendo un 2,01% de la grasa de ácidos grasos saturados y un 6,7% de ácidos grasos poliinsaturados. Estos valores están dentro de las pautas de la AHA de $\leq 30\%$ de las calorías totales de la grasa, $< 10\%$ de las calorías del ácidos grasos saturados, y $\leq 10\%$ de las calorías totales de ácidos grasos poliinsaturados.

Carbohidrato

ENSURE CON FIBRA contiene una combinación de maltodextrina y sacarosa. El suave dulzor y la variedad de sabores (vainilla, chocolate, y manteca de pecán), más VARI-FLAVORS® Flavor Pacs en pecán, cereza, fresa, limón, y naranja, ayudan a evitar el cansancio del sabor y contribuyen a la conformidad del paciente.

ES 2 310 652 T3

Vainilla y otros sabores distintos de chocolate

5	Maltodextrina	66%
	Sacarosa	25%
10	Fibra de Avena	7%
	Fibra de Soja	2%

Chocolate

15	Maltodextrina	55%
20	Sacarosa	36%
	Fibra de avena	7%
25	Fibra de soja	2%

Fibra

30 La combinación de fibra utilizada en ENSURE CON FIBRA consiste en fibra de avena y polisacárido de soja. Esta combinación da como resultado aproximadamente 4 gramos de fibra dietética total por lata de 2,3 dL. La razón de fibra insoluble con respecto a soluble es de 95:5.

35 Los diversos suplementos nutricionales descritos antes y conocidos por otros expertos en la técnica pueden ser sustituidos y/o complementados con los PUFA producidos de acuerdo con la presente invención.

J. Producto Nutricional Oxepa®

40 Oxepa es un producto nutricional entérico, calóricamente denso, con bajo contenido de carbohidratos diseñado para el tratamiento dietético de pacientes que padecen o tienen el riesgo de padecer ARDS. Tiene una única combinación de ingredientes, incluyendo una combinación de aceites patentada que contiene ácido eicosapentaenoico (EPA de aceite de pescado), ácido γ -linolénico (GLA de aceite de borraja), y elevados niveles de antioxidante.

Distribución Calórica

45 La densidad calórica es elevada a 1,5 Cal/mL (355 Cal/2,3 dL), para minimizar el volumen requerido para satisfacer las necesidades de energía. La distribución de Calorías en Oxepa se muestra en la Tabla A.

50 TABLA A

Distribución Calórica de Oxepa

55		por 2,3 dL	por litro	% de Cal
	Calorías	355	1.500	---
60	Grasa (g)	22,2	93,7	55,2
	Carbohidrato (g)	25	105,5	28,1
65	Proteína (g)	14,8	62,5	16,7
	Agua (g)	186	785	---

ES 2 310 652 T3

Grasa

- Oxepa contiene 22,2 g de grasa por porción de 2,3 dL (93,7 g/L).

5 • La fuente de grasa es una combinación de grasa con un 31,8% de aceite de canola, un 25% de triglicéridos de cadena media (MCT), un 20% de aceite de borraja, un 20% de aceite de pescado, y un 3,2% de lecitina de soja. El perfil de ácidos grasos típico de Oxepa se muestra en la Tabla B.

10 • Oxepa proporciona una cantidad equilibrada de ácidos grasos poliinsaturados, monosaturados y saturados, como se muestra en la Tabla VI.

• Los triglicéridos de cadena media (MCT) -- 25% de la combinación de grasas -- contribuyen al vaciado gástrico debido a que son absorbidos por el tracto intestinal sin emulsificación por los ácidos biliares.

15 Los diversos ácidos grasos componentes del producto nutricional Oxepa® pueden ser sustituidos y/o complementados con los PUFA producidos de acuerdo con esta invención.

20 TABLA B

Perfil de Ácidos Grasos Típico

	% Ácidos Grasos Totales	g/2,3 dL*	g/L*	
25				
30	Caproico (6:0)	0,2	0,04	0,18
	Caprílico (8:0)	14,69	3,1	13,07
35	Cáprico (10:0)	11,06	2,33	9,87
	Palmítico (16:0)	5,59	1,18	4,98
40	Palmitoleico	1,82	0,38	1,62
	Esteárico	1,94	0,39	1,64
45	Oleico	24,44	5,16	21,75
	Linoleico	16,28	3,44	14,49
50	α-Linolenico	3,47	0,73	3,09
	γ-Linolenico	4,82	1,02	4,29
	Eicosapentaenoico	5,11	1,08	4,55
55	n-3-Docosapentaenoico	0,55	0,12	0,49
	Docosahexaenoico	2,27	0,48	2,02
60	Otros	7,55	1,52	6,72

65 Los ácidos grasos suman aproximadamente el 95% de la grasa total.

ES 2 310 652 T3

TABLA C

Perfil Graso de Oxepa

5	% calorías totales de grasa	55,2
10	Ácidos grasos poliinsaturados	31,44 g/L
10	Ácidos grasos monoinsaturados	25,53 g/L
15	Ácidos grasos saturados	32,38 g/L
15	Razón n-6 a n-3	1,75:1
20	Colesterol	9,49 mg/2,3 dL
20		40,1 mg/L

Carbohidrato

- El contenido de carbohidrato es de 25,0 g por porción de 2,3 dL (105,5 g/L).
- Las fuentes de carbohidrato son 45% de maltodextrina (un carbohidrato complejo) y 55% de sacarosa (un azúcar simple), ambas las cuales son fácilmente digeridas y absorbidas.
- El alto contenido de grasa y el bajo contenido de carbohidratos de Oxepa están diseñados para minimizar la producción de dióxido de carbono (CO₂). Los elevados niveles de CO₂ pueden complicar la retirada en los pacientes dependientes de un ventilador. El bajo nivel de carbohidratos también puede ser útil para aquellos pacientes que han desarrollado hiperglucemia inducida por el estrés.
- Oxepa carece de lactosa.

El carbohidrato dietético, los aminoácidos de las proteínas, y el radical glicerol de las grasas se pueden convertir en glucosa en el organismo. En todo este proceso, se satisfacen los requerimientos de carbohidratos de los tejidos dependientes de glucosa (tales como el sistema nervioso central y los glóbulos rojos de la sangre). No obstante, una dieta sin carbohidratos puede conducir a cetosis, catabolismo excesivo de las proteínas de los tejidos, y pérdida de fluidos y electrolitos. Estos efectos se pueden evitar mediante la ingestión diaria de 50 a 100 g de carbohidrato digestible, si la ingesta calórica es adecuada. El nivel de carbohidratos en Oxepa también es suficiente para minimizar la gluconeogénesis, si las necesidades de energía están satisfechas.

Proteína

- Oxepa contiene 14,8 g de proteína por ración de 2,3 dL (62,5 g/L).
- La razón de calorías/nitrógeno total (150:1) satisface la necesidad de los pacientes con estrés.
- Oxepa proporciona suficiente proteína para promover el anabolismo y el mantenimiento de la masa muscular sin precipitar problemas respiratorios. Las ingestas con alto contenido de proteína están involucradas en pacientes con insuficiencia respiratoria. Aunque la proteína tiene un pequeño efecto sobre la producción de CO₂, una dieta con elevado contenido de proteína aumentará el control de la ventilación.
- Las fuentes de proteína de Oxepa son 86,8% de caseinato de sodio y 13,2% de caseinato de calcio.
- El perfil de aminoácidos del sistema de proteínas de Oxepa satisface o supera el patrón de proteína de alta calidad establecido por la Academia Nacional de Ciencias.
- Oxepa carece de gluten.

ES 2 310 652 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una secuencia de nucleótidos aislada que comprende o complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa, donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos 50% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 42.
- 10 2. Una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa, comprendiendo dicha secuencia de nucleótidos o complementaria a una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 50% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 41.
- 15 3. La secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 2, donde dicha secuencia se selecciona del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 41.
- 20 4. La secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 2 o 3, donde dicha secuencia codifica una desaturasa funcionalmente activa que utiliza un ácido graso poliinsaturado como sustrato.
- 25 5. La secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 1 o 2, donde dicha secuencia deriva de *Saprolegnia diclina*.
- 30 6. Un polipéptido purificado codificado por dicha secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 1 o 2.
- 35 7. Un polipéptido purificado que desatura un ácido graso poliinsaturado sustrato en un carbono omega-3 de dicho sustrato y tiene una identidad de aminoácidos de al menos 50% con una secuencia de aminoácidos que comprende el SEQ ID NO: 26.
- 40 8. El polipéptido purificado de la reivindicación 7, donde dicho polipéptido desatura un ácido graso sustrato que tiene 20 átomos de carbono.
- 45 9. Un polipéptido purificado que desatura un ácido graso poliinsaturado sustrato en un carbono delta-12 de dicho sustrato y tiene una identidad de aminoácidos de al menos 50% con el SEQ ID NO: 42.
- 50 10. El polipéptido purificado de la reivindicación 9, donde dicho polipéptido desatura un ácido graso sustrato que tiene 18 átomos de carbono.
- 55 11. Un método de producción de una desaturasa que comprende las etapas de:
- 60 (a) aislar una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa, comprendiendo dicha secuencia de nucleótidos o complementaria a una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 50% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 41;
- 65 (b) construir un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos aislada de la etapa (a); y
- (c) introducir dicho vector de la etapa (b) en una célula anfitriona durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la expresión de una desaturasa codificada por dicha secuencia de nucleótidos aislada de la etapa (a).
- 70 12. Un vector que comprende: 1) una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa, correspondiente dicha secuencia de nucleótidos o complementaria a una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 50% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 41, conectada operablemente a b) una secuencia reguladora.
- 75 13. Una célula anfitriona que comprende dicho vector de la reivindicación 12.
- 80 14. La célula anfitriona de la reivindicación 13, donde dicha célula anfitriona es una célula eucariótica seleccionada del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula vegetal y una célula fúngica.
- 85 15. La célula anfitriona de la reivindicación 14, donde la expresión de dicha secuencia de nucleótidos aislada de dicho vector da como resultado dicha célula anfitriona productora de un ácido graso poliinsaturado que no es producido en el tipo salvaje de dicha célula anfitriona.
- 90 16. Una célula vegetal, planta, o tejido vegetal que comprende dicho vector de la reivindicación 12, donde la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de dicho vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado por dicha célula vegetal, planta o tejido vegetal.

ES 2 310 652 T3

17. La célula vegetal, planta, o tejido vegetal de la reivindicación 16, donde dicho vector induce la producción de un ácido graso poliinsaturado seleccionado del grupo que consiste en ácido linoleico, ácido eicosatetraenoico y ácido eicosapentaenoico.
- 5 18. Una planta transgénica que comprende dicho vector de la reivindicación 12, donde la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de dicho vector da como resultado la producción de un ácido graso poliinsaturado en las semillas de dicha planta transgénica.
- 10 19. Un método para producir un ácido graso poliinsaturado que comprende las etapas de:
- (a) aislar una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa, comprendiendo dicha secuencia de nucleótidos o complementaria a una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 50% con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 41;
 - (b) construir un vector que comprenda dicha secuencia de nucleótidos aislada de la etapa (a);
 - (c) transformar el vector de la etapa (b) en una célula anfitriona durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para la expresión de una desaturasa codificada por dicha secuencia de nucleótidos aislada de la etapa (a); y
 - (d) exponer dicha desaturasa expresada seleccionada del grupo que consiste en una omega-3 desaturasa y una delta-12 desaturasa, a un ácido graso sustrato, por medio de lo cual dicho sustrato es convertido catalíticamente por dicha desaturasa en un ácido graso poliinsaturado producto deseado.
- 20 20. El método de la reivindicación 19, donde dicho sustrato es ácido dihomo-gamma-linolénico o ácido araquidónico y dicho ácido graso poliinsaturado producto es ácido eicosatetraenoico o ácido eicosapentaenoico, respectivamente, cuando dicha desaturasa expresada es una omega-3 desaturasa, o
- 30 donde dicho ácido graso poliinsaturado sustrato es ácido oleico y dicho ácido graso poliinsaturado producto es ácido linoleico, cuando dicha desaturasa expresada es una delta-12 desaturasa.
21. El método de la reivindicación 19, que comprende además de la etapa (d), la etapa de:
- (e) exponer dicho ácido graso poliinsaturado producto de la etapa (d) a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una desaturasa y una elongasa, por medio de lo cual el ácido graso poliinsaturado producto de la etapa (d) es convertido catalíticamente en otro ácido graso poliinsaturado producto.
- 40 22. El método de la reivindicación 21, donde dicho ácido graso poliinsaturado producto es ácido eicosatetraenoico o ácido eicosapentaenoico y dicho otro ácido graso poliinsaturado es ácido eicosapentaenoico o ácido omega-3-docosapentaenoico, respectivamente, cuando dicha desaturasa expresada de la etapa (d) es una omega-3 desaturasa, o
- 45 donde dicho ácido graso poliinsaturado producto es ácido linoleico y dicho otro ácido graso poliinsaturado es ácido gamma-linolénico, cuando dicha desaturasa expresada de la etapa (d) es una delta-12 desaturasa.
23. El método de la reivindicación 22 que comprende adicionalmente la etapa de exponer dicho otro ácido graso poliinsaturado a una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una desaturasa y una elongasa con el fin de convertir dicho otro ácido graso poliinsaturado en un ácido graso poliinsaturado final.
- 50 24. El método de la reivindicación 23 donde dicho ácido graso poliinsaturado final se selecciona del grupo que consiste en ácido omega-3-docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, cuando dicha desaturasa expresada de la etapa (d) es una omega-3 desaturasa, o
- 55 donde dicho ácido graso poliinsaturado final se selecciona del grupo que consiste en ácido dihomo-gamma-linolénico, ácido araquidónico, ácido adrenico, ácido omega-6-docosapentaenoico, ácido eicosatetraenoico, ácido estearidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido omega-3-docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, cuando dicha desaturasa expresada de la etapa (d) es una delta-12 desaturasa.
- 60 25. Un método de producción de un ácido graso poliinsaturado que comprende exponer un ácido graso sustrato a un polipéptido que tiene una identidad de aminoácidos de al menos 50% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 42, por medio de lo cual dicho ácido graso sustrato es convertido catalíticamente en dicho ácido graso poliinsaturado.
- 65

ES 2 310 652 T3

26. El método de la reivindicación 25, donde el ácido graso sustrato es ácido dihomo-gamma-linolénico o ácido araquidónico y dicho ácido graso poliinsaturado producto es ácido eicosatetraenoico o ácido eicosapentaenoico, respectivamente, cuando dicho polipéptido es una omega-3 desaturasa, o

5 donde dicho ácido graso sustrato es ácido oleico y dicho ácido graso poliinsaturado es ácido linoleico, cuando dicho polipéptido es una delta-12 desaturasa.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

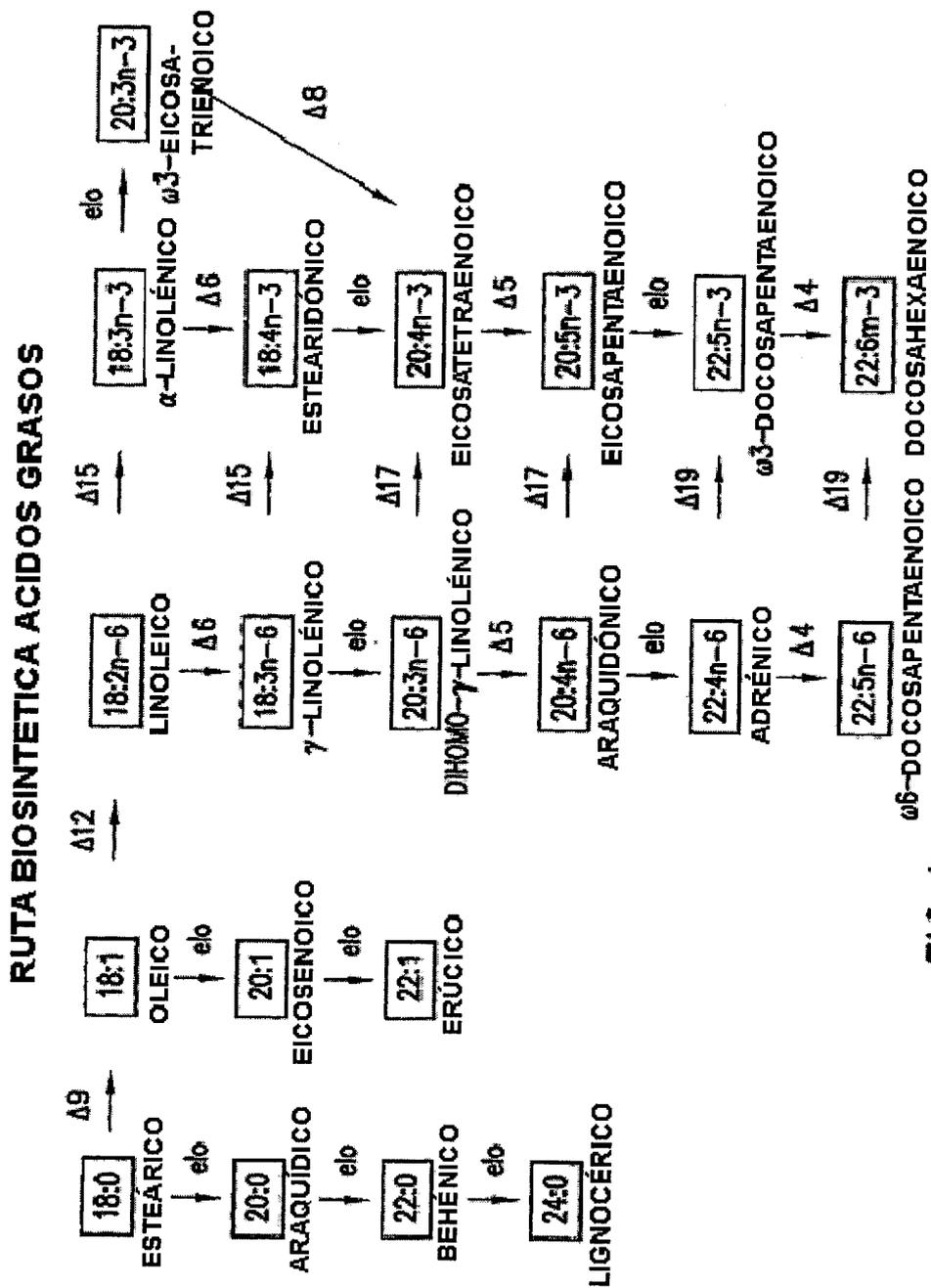


FIG.1

**Secuencia Génica de *sdd17*, un Gen de Desaturasa de Acidos Grasos
Omega-3 de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851)**

```

1  ATGACTGAGG ATAAGACGAA GGTCGAGTTC CCGACGCTCA CGGAGCTCAA
51  GCACTCGATC CCGAACGCGT GCTTTGAGTC GAACCTCGGC CTCTCGCTCT
101 ACTACACGGC CCGCGCGATC TTCAACGCGT CGGCCTCGGC GCGCTGCTC
151 TACGCGGCGC GCTCGACGCC GTTCATTGCC GATAACGTTT TGCTCCACGC
201 GCTCGTTTGC GCCACCTACA TCTACGTGCA GGGCGTCATC TTCTGGGGCT
251 TCTTCACGGT CGGCCACGAC TGGCGCCACT CGGCCTTCTC GCGCTACCAC
301 AGCGTCAACT TTATCATCGG CTGCATCATG CACTCTGCGA TTTTGACGCC
351 GTTCGAGAGC TGGCGCGTGA CGCACCGCCA CCACCACAAG AACACGGGCA
401 ACATTGATAA GGACGAGATC TTTTACCCGC ACCGGTCGGT CAAGGACCTC
451 CAGGACGTGC GCCAATGGGT CTACACGCTC GCGGGTGCCT GGTGTTGCTA
501 CTTGAAGGTC GGGTATGCCG CGCGCACGAT GAGCCACTTT GACCCGTGGG
551 ACCCGCTCCT CCTTCGCCGC GCGTCGGCCG TCATCGTGTC GCTCGGGCTC
601 TGGGCCGCCT TCTTCGCCGC GTACGCGTAC CTCACATACT CGCTCGGCTT
651 TGCCGTCATG GGCCTCTACT ACTATGCGCC GCTCTTTGTC TTTGCTTCGT
701 TCCTCGTCAT TACGACCTTC TTGCACCACA ACGACGAAGC GACGCCGTGG
751 TACGGCGACT CGGAGTGGAC GTACGTCAAG GGCAACCTCT CGAGCGTCGA
801 CCGCTCGTAC GCGCGGTTTC TGGACAACCT GAGCCACCAC ATTGGCACGC
851 ACCAGGTCCA CCACTTGTTT CCGATCATTG CGCACTACAA GCTCAACGAA
901 GCCACCAAGC ACTTTGCGGC CGCGTACCCG CACCTCGTGC GCAGGAACGA
951 CGAGCCCATC ATCACGGCCT TCTTCAAGAC CGCGCACCTC TTTGTCAACT
1001 ACGGCGCTGT GCCCGAGACG GCGCAGATCT TCACGCTCAA AGAGTCGGCC
1051 GCGGCCGCCA AGGCCAAGTC GGAATAA

```

FIG.2

**Secuencia de Aminoácidos de una Desaturasa de Acidos Grasos Omega-3
(SDD17) de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851)**

1 MTEDKTKVEF PTLTELKHSI PNACFESNLG LSLYYTARAI FNASASAALL
51 YAARSTPFIA DNVLLHALVC ATYIYVQGVI FWGFFTVGHD CGHSAFSRYH
101 SVNFIIGCIM HSAILTPFES WRVTHRHHHK NTGNIDKDEI FYPHRSVKDL
151 QDVRQWVYTL GGAWFVYLKV GYAPRTMSHF DPWDPLLLRR ASAVIVSLGV
201 WAAFFAAYAY LTYSLGFAVM GLYYYAPLFV FASFLVITTF LHHNDEATPW
251 YGDSEWYVK GNLSSVDRSY GAFVDNLSSH IGTHQVHHLF PIIPHYKLNE
301 ATKHFAAAYP HLVRRNDEPI ITAFFKTAHL FVNYGAVPET AQIFTLKESA
351 AAAKAKSD*

FIG.3

Análisis comparativo de Delta 17-desaturasa de *S. diclina* (SDD17.pep) y Delta 17-desaturasa de *C. elegans* (CELEFAT)

Marco: 1 inc: 490 inc1: 222 opt: puntuación Z 502: 724,0 esperado(); 2.3e-32
 Identidad 31,6% en solapamiento de 310 aa

(2-303:49-347)

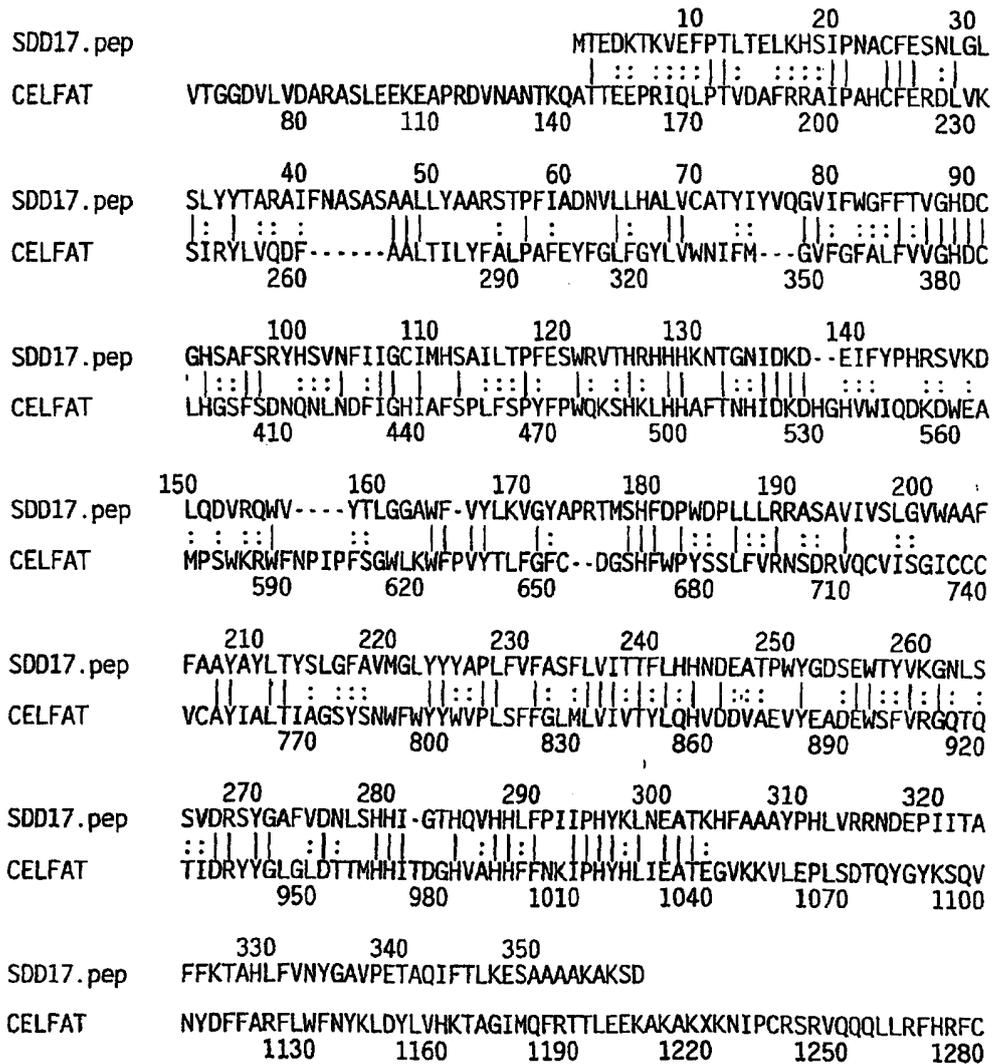


FIG.5

Secuencia Génica de *sdd12*, un Gen de Delta 12-Desaturasa de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851)

```

1  ATGTGCAAAG GTCAAGCTCC TTCCAAGGCC GACGTGTTCC ACGCTGCGGG
51  GTACCGCCCG GTCGCCGGCA CGCCGAGCC GCTGCCGCTG GAGCCCCCGA
101 CGATCACGCT CAAGGACCTG CGCGCGGCGA TCCCGGCCCA CTGCTTTGAG
151 CGCAGCGCTG CCACTAGCTT TTACCATTTG GCCAAGAACC TTGCGATCTG
201 CGCCGGCGTG TTCGCCGTTG GCCTCAAGCT CGCGGCTGCC GACTTGCCGC
251 TCGCGGCCAA GCTGGTCGCG TGGCCATCT ACTGGTTCGT CCAGGGCACG
301 TACTTTACGG GCATCTGGGT CATTGCGCAC GAATGCGGCC ACCAGGCGTT
351 CTCGGCGTCC GAGATCCTCA ACGACACGGT CGGTATCATT CTTACTCGC
401 TCCTCTTTGT GCCGTACCAC AGCTGGAAGA TCACGCACCG CCGCCACCAC
451 TCCAACACGG GCAGCTGCGA GAACGACGAG GTGTTTACGC CGACGCCGCG
501 GTCCGTGTCG GAGGCCAAGC ACGACCACTC GCTCCTCGAA GAGAGCCCGC
551 TCTACAACCT GTACGGCATC GTCATGATGC TTCTCGTGGG CTGGATGCCG
601 GGCTACCTCT TCTTCAACGC GACCGGCCCG ACCAAGTACG CTGGCCTCGC
651 CAAGTCGCAC TTCAACCCGT ACGCAGCCTT TTTCTCCCA AAGGAGCGCC
701 TCAGCATCTG GTGGAGCGAC CTCTGCTTCC TCGCGGCCTT GTACGGCTTT
751 GGCTACGGCG TCTCGGTCTT CGGCCTCCTC GATGTCGCC GCGACTACAT
801 CGTGCCGTAC CTCATTTGCA ACGCGTACCT CGTGCTCATC ACGTACCTCC
851 AGCACACGGA TACGTACGTG CCCCACTTCC GCGGCGACGA GTGGAActGG
901 CTGCGCGGCG CGCTCTGCAC CGTCGACCGC TCGTTCGGCG CGTGGATCGA
951 CAGCGCGATC CACCACATTG CCGACACGCA CGTGACGCAC CACATTTTCT
1001 CCAAGACGCC CTTCTACCAC GCGATCGAGG CGACCGACGC CATCACGCC
1051 CTCCTCGGCA AGTACTACCT CATCGACCCG ACGCCGATCC CGCTGGCGCT
1101 CTGGCGCTCG TTCACGCACT GCAAGTACGT CGAGGACGAC GGCAACGTTG
1151 TGTTTTACAA GCGCAAGCTC GAGGAAAAGT AA

```

FIG.6

Secuencia de Aminoácidos de *sdd12*, un Gen de la Delta 12-Desaturasa de *Saprolegnia diclina* (ATCC 56851)

1 MCKGQAPSKA DVFHAAGYRP VAGTPEPLPL EPPTITLKDL RAAIPAHCFE
51 RSAATSFYHL AKNLAICAGV FAVGLKLAAL DLPLAAKLVA WPIYWVQGT
101 YFTGIWVIAH ECGHQAFSAS EILNDTVGII LHSLLFVPYH SWKITHRRHH
151 SNTGSCENDE VFTPTPRSVV EAKHDHSLLE ESPLYNLYGI VMMLLVGWMP
201 GYLFFNATGP TKYAGLAKSH FNPYAFFLP KERLSIWWSL LCFLAALYGF
251 GYGVSVFGLL DVARHYIVPY LICNAYLVLV TYLQHTDTYV PHFRGDEWNW
301 LRGALCTVDR SFGAWIDSAI HHIADTHVTH HIFSKTPFYH AIEATDAITP
351 LLGKYYLIDP TPIPLALWRS FTHCKYVEDD GNVVIFYKRKL EEK*

FIG.7

Análisis comparativo de Delta 12-desaturasa de *S. diclina* (SDD12.pep) y Delta 12-Desaturasa de *G. hirsutum* (GH06DES)

Marco: 3 inic: 992 inc1: 413 opt: puntuación Z 1086: 1531.8 (esperado(): 2.3e-77
 identidad 45,6% en solapamiento de 379 aa
 (9-380:14-384)

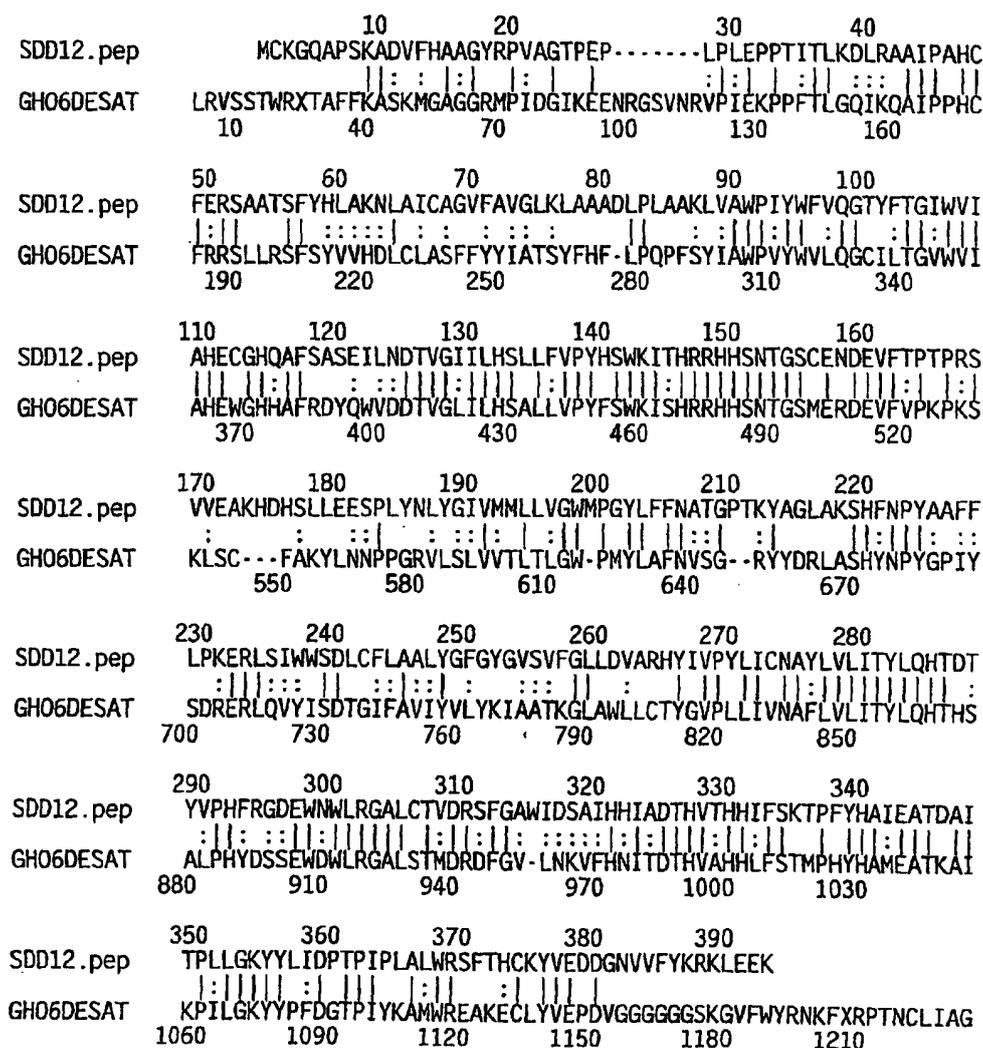


FIG.8

ES 2 310 652 T3

ID Secuencia:

ID Secuencia 1

5' -ATC CGC GCC GCC ATC CCC AAG CAC TGC TGG GTC AAG-3'

ID Secuencia 2

5' -GCC CTC TTC GTC CTC GGC CAY GAC TGC GGC CAY GGC TCG TTC TCG-3'

ID Secuencia 3

5' -GAG RTG GTA RTG GGG GAT CTG GGG GAA GAR RTG RTG GRY GAC RTG-3'

ID Secuencia 4

5' -CCC TAC CAY GGC TGG CGC ATC TCG CAY CGC ACC CAY CAY CAG AAC-3'

ID Secuencia 5

5' -GTT CTG RTG RTG GGT CCG RTG CGA GAT GCG CCA GCC RTG GTA GGG-3'

ID Secuencia 6

5' -GGC TCG CAC TTC SAC CCC KAC TCG GAC CTC TTC GTC-3'

ID Secuencia 7

5' -GAC GAA GAG GTC CGA GTM GGG GTW GAA GTG CGA GCC-3'

ID Secuencia 8

5' -GCG CTG GAK GGT GGT GAG GCC GCC GCG GAW GSA CGA CCA-3'

ID Secuencia 9

5' -CTG GGG GAA GAG RTG RTG GAT GAC RTG GGT GCC GAT GTC RTG RTG-3'

ID Secuencia 10

5' -GGT GGC CTC GAY GAG RTG GTA RTG GGG GAT CTK GGG GAA GAR RTG-3'

ID Secuencia 11

5' -GAG RTG GTA RTG GGG GAT CTG GGG GAA GAR RTG RTG GRY GAC RTG-3'

ID Secuencia 12

5' -TAC GCG TAC CTC ACG TAC TCG CTC G-3'

ID Secuencia 13

5' -TTC TTG CAC CAC AAC GAC GAA GCG ACG-3'

ID Secuencia 14

5' -GGA GTG GAC GTA CGT CAA GGG CAA C-3'

ID Secuencia 15

5' -TCA AGG GCA ACC TCT CGA GCG TCG AC-3'

ID Secuencia 16

5' -CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA G-3'

FIG.9A

ES 2 310 652 T3

ID Secuencia 17

5' - AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA AAC AGC -3'

ID Secuencia 18

5' -GGT AAA AGA TCT CGT CCT TGT CGA TGT TGC-3'

ID Secuencia 19

5' -GTC AAA GTG GCT CAT CGT GC-3'

ID Secuencia 20

5' -CGA GCG AGT ACG TGA GGT ACG CGT AC-3'

ID Secuencia 21

5' -TCA ACA GAA TTC ATG ACC GAG GAT AAG ACG AAG GTC GAG TTC CCG-3'

ID Secuencia 22

5' -AAA AGA AAG CTT CGC TTC CTA GTC TTA GTC CGA CTT GGC CTT GGC-3'

ID Secuencia 23

5' -TCA ACA AAG CTT ATG ACC GAG GAT AAG ACG AAG GTC GAG TTC CCG-3'

ID Secuencia 24

5' -AAA AGA GAA TTC CGC TTC CTA GTC TTA GTC CGA CTT GGC CTT GGC-3'

ID Secuencia 25

1	ATGACTGAGG	ATAAGACGAA	GGTCGAGTTC	CCGACGCTCA	CGGAGCTCAA
51	GCACTCGATC	CCGAACGCGT	GCTTTGAGTC	GAACCTCGGC	CTCTCGCTCT
101	ACTACACGGC	CCGCGCGATC	TTCAACGCGT	CGGCCTCGGC	GGCGTGCTC
151	TACGCGGCGC	GCTCGACGCC	GTTCAATTGCC	GATAACGTTT	TGCTCCACGC
201	GCTCGTTTGC	GCCACCTACA	TCTACGTGCA	GGGCGTCATC	TTCTGGGGCT
251	TCTTCACGGT	CGGCCACGAC	TGCGGCCACT	CGGCCTTCTC	GCGCTACCAC
301	AGCGTCAACT	TTATCATCGG	CTGCATCATG	CACTCTGCGA	TTTTGACGCC
351	GTTCGAGAGC	TGGCGCGTGA	CGCACCGCCA	CCACCACAAG	AACACGGGCA
401	ACATTGATAA	GGACGAGATC	TTTTACCCGC	ACCGGTCGGT	CAAGGACCTC
451	CAGGACGTGC	GCCAATGGGT	CTACACGCTC	GGCGGTGCGT	GGTTTGTCTA
501	CTTGAAGGTC	GGGTATGCC	CGCGCACGAT	GAGCCACTTT	GACCCGTGGG
551	ACCCGCTCCT	CCTTCGCCGC	GCGTCGGCCG	TCATCGTGTC	GCTCGGCGTC
601	TGGGCCGCCT	TCTTCGCCGC	GTACGCGTAC	CTCACATACT	CGCTCGGCTT
651	TGCCGTGATG	GGCCTCTACT	ACTATGCGCC	GCTCTTTGTC	TTTGCTTCGT
701	TCCTCGTCAT	TACGACCTTC	TTGCACCACA	ACGACGAAGC	GACGCCGTGG
751	TACGGCGACT	CGGAGTGGAC	GTACGTCAAG	GGCAACCTCT	CGAGCGTCGA
801	CCGCTCGTAC	GGCGCGTTTC	TGGACAACCT	GAGCCACCAC	ATTGGCACGC
851	ACCAGGTCCA	CCACTTGTTT	CCGATCATT	CGCACTACAA	GCTCAACGAA
901	GCCACCAAGC	ACTTTGCGGC	CGCGTACCCG	CACCTCGTGC	GCAGGAACGA
951	CGAGCCCATC	ATCACGGCCT	TCTTCAAGAC	CGCGCACCTC	TTTGTCAACT
1001	ACGGCGCTGT	GCCCGAGACG	GCGCAGATCT	TCACGCTCAA	AGAGTCGGCC
1051	GCGGCCGCCA	AGGCCAAGTC	GGACTAA		

FIG.9B

ID Secuencia 26

1 MTEDKTKVEF PTLTELKHSI PNACFESNLG LSLYYTARAI FNASASAALL
 51 YAARSTPFIA DNVLLHALVC ATYIYVQGI FWGFFTVDGHD CGHSAFSRYH
 101 SVNFIIGCIM HSAILTPFES WRVTHRHKK NTGNIDKDEI FYPHRSVKDL
 151 QDVRQWVYTL GGAWFVYLKV GYAPRTMSHF DPWDPLLLRR ASAVIVSLGV
 201 WAAFFAAYAY LTYSLGFAVM GLYYYAPLFV FASFLVITTF LHHNDEATPW
 251 YGDSEWTVK GNLSVDRSY GAFVDNLSSH IGTHQVHHLF PIIPHYKLE
 301 ATKHFAAAYP HLVRNDEPI ITAFFKTAHL FVNYGAVPET AQIFTLKESA
 351 AAAKAKSD*

ID Secuencia 27

1 ATGGCCCCGC AGACGGAGCT CCGCCAGCGC CACGCCGCCG TCGCCGAGAC
 51 GCCGGTGGCC GGCAAGAAGG CCTTTACATG GCAGGAGGTC GCGCAGCACA
 101 ACACGGCCGC CTCGGCCTGG ATCATTATCC GCGGCAAGGT CTACGACGTG
 151 ACCGAGTGGG CCAACAAGCA CCCCGGCGGC CGCGAGATGG TGCTGTGCA
 201 CGCCGGTCCG GAGGCCACCG ACACGTTGGA CTCGTACCAC CCGTTCAGCG
 251 ACAAGGCCGA GTCGATCTTG AACAAGTATG AGATTGGCAC GTTCACGGGC
 301 CCGTCCGAGT TTCGACCTT CAAGCCGGAC ACGGGCTTCT ACAAGGAGTG
 351 CCGCAAGCGC GTTGGCGAGT ACTTCAAGAA GAACAACCTC CATCCGCAGG
 401 ACGGCTTCCC GGGCCTCTGG CGCATGATGG TCGTGTGTC GGTGCGCCGGC
 451 CTCGCCTTGT ACGGCATGCA CTTTTGACT ATCTTTGCGC TGCAGCTCGC
 501 GGCCGCGGGC CTCCTTGGCG TCTGCCAGGC GCTGCCGCTG CTCCACGTCA
 551 TGCACGACTC GTCGCACGGC TCGTACACCA ACATGCCGTT CTTCCATTAC
 601 GTCGTGCGCC GCTTTGCCAT GGACTGGTTT GCCGGCGGCT CGATGGTGTG
 651 ATGGCTCAAC CAGCACGTCG TGGGCCACCA CATCTACACG AACGTGCGGG
 701 GCTCGGACCC GGATCTTCCG GTCACATGG ACGGCGACAT CCGCCGCATC
 751 GTGAACCGCC AGGTGTTCCA GCCCATGTAC GCATTCCAGC ACATCTACCT
 801 TCCGCCGCTC TATGGCGTGC TTGGCCTCAA GTTCCGCATC CAGGACTTCA
 851 CCGACACGTT CGGCTCGCAC ACGAACGGCC CGATCCGCGT CAACCCGCAC
 901 GCGCTCTCGA CGTGGATGGC CATGATCAGC TCCAAGTCGT TCTGGGCCTT
 951 CTACCGCGTG TACCTTCCGC TTGCCGTGCT CCAGATGCCC ATCAAGACGT
 1001 ACCTTGCGAT CTTCTTCCCT GCCGAGTTTG TCACGGGCTG GTACCTCGCG
 1051 TTCAACTTCC AAGTAAGCCA TGTCTCGACC GAGTGGGCT ACCCATGCGG
 1101 CGACGAGGCC AAGATGGCGC TCCAGGACGA GTGGGCAGTC TCGCAGGTCA
 1151 AGACGTGCGT CGACTACGCC CATGGCTCGT GGATGACGAC GTTCTTGCC
 1201 GCGCGCTCA ACTACCAGGT CGTGCACCAC TTGTTCCCA GCGTGTGCGA
 1251 GTACCACTAC CCGGCGATCG CGCCATCAT CGTCGACGTC TGCAAGGAGT
 1301 ACAACATCAA GTACGCCATC TTGCCGGACT TTACGGCGGC GTTCTGTGCC
 1351 CACTTGAAGC ACCTCCGCAA CATGGGCCAG CAGGGCATCG CCGCCACGAT
 1401 CCACATGGGC TAA

FIG.9C

ES 2 310 652 T3

ID Secuencia 28

```
1 ATGGCAAACA GCAGCGTGTG GGATGATGTG GTGGGCCGCG TGGAGACCGG
51 CGTGGACCAG TGGATGGATG GCGCCAAGCC GTACGCACTC ACCGATGGGC
101 TCCCGATGAT GGACGTGTCC ACCATGCTGG CATTGAGGT GGGATACATG
151 GCCATGCTGC TCTTCGCAT CCGATCATG AAGCAGATGG AGAAGCCTTT
201 TGAGCTCAAG ACCATCAAGC TCTTGACAAA CTTGTTTCTC TTCGGACTTT
251 CCTTGTACAT GTGCGTGGAG ACCATCCGCC AGGCTATCCT CGGAGGCTAC
301 AAAGTGTGTTG GAAACGACAT GGAGAAGGGC AACGAGTCTC ATGCTCAGGG
351 CATGTCTCGC ATCGTGTACG TGTCTGCGT GTCCAAGGCA TACGAGTTCT
401 TGGATACCGC CATCATGATC CTTTGCAAGA AGTTCAACCA GGTTCCTTC
451 TTGCATGTGT ACCACCATGC CACCATTTTT GCCATCTGGT GGGCTATCGC
501 CAAGTACGCT CCAGGAGGTG ATGCGTACTT TTCAGTGATC CTCAACTCTT
551 TCGTGCACAC CGTCATGTAC GCATACTACT TCTTCTCCTC CCAAGGGTTC
601 GGGTTCGTGA AGCCAATCAA GCCGTACATC ACCACCCTTC AGATGACCCA
651 GTTCATGGCA ATGCTTGTGC AGTCCTTGTG CGACTACCTC TTCCCATGCG
701 ATTACCCACA GGCTCTGTG CAGCTTCTTG GAGTGACAT GATCACCTTG
751 CTTGCCCTCT TCGGCAACTT TTTTGTGCAG AGCTATCTTA AAAAGCCAAA
801 AAAGAGCAAG ACCAACTAA
```

ID Secuencia 29

```
1 MTVGFDETVT MDTVRNHNMP DDAWCAIHGT VYDITKFSKV HPGGDIIMLA
51 AGKEATILFE TYHIKVPDA VLRKYKVGKL PQGKKGETSH MPTGLDSASY
101 YSWDSEFYRV LRERVAKKLA EPGLMQRARM ELWAKAIFLL AGFWGSLYAM
151 CVLDPHGGAM VAAVTLGVFA AFVGTCTIQHD GSHGAFSKSR FMNKAAGWTL
201 DMIGASAMTW EMQVHLGHP YTNLIEMENG LAKVKGADVD PKKVDQESDP
251 DVFSTYPLMR LHPWHRQRFY HKFQHLYAPL IFGFMTINKV ISQDVGVVLR
301 KRLFQIDANC RYGSPWNVAR FWIMKLLTTL YMVALPMYMQ GPAQGLKLF
351 MAHFTCGEVL ATMFIVNHII EGVSYASKDA VKGVMAPPRT VHGVTPMQVT
401 QKALSAAEST KSDADKTTMI PLNDWAAVQC QTSVNWAVGS WFWNHFSGGL
451 NHQIEHCFP QNPHTVNVYI SGIVKETCEE YGVPYQAEIS LFSAYFKMLS
501 HLRTLGNEDL TAWST*
```

ID Secuencia 30

5'-CCG SAG TTC ACS ATC AAG GAG ATC CGC GAS KSC ATC CCG GCC CAC TGC TTC -3'

ID Secuencia 31

5'-GRS CTT CTT GAK GTG GWM SGT GGC CTC CTC GGC GTG GTA GWR CGG CAT-3'

ID Secuencia 32

5'-CCS STC TAC TGG GCC TGC CAG GGT RTC GTC CTC ACS GGT GTC TGG-3'

FIG.9D

ES 2 310 652 T3

ID Secuencia 33

5'-CCS STC TAC TGG ATC RYS CAG GGT RTC GTC KGY ACS GGT GTC TGG-3'

ID Secuencia 34

5'-GGC GTG GTA GTG CGG CAT SMM CGA GAA GAR GTG GTG GGC GAC GTG-3'

ID Secuencia 35

5'-CAC GTA CCT CCA GCA CAC GGA CAC CTA CG-3'

ID Secuencia 36

5'-GAT CGA CAG CGC GAT CCA CCA CAT TGC-3'

ID Secuencia 37

5'-CAA ATG GTA AAA GCT AGT GGC AGC GCT GC-3'

ID Secuencia 38

5'-AGT ACG TGC CCT GGA CGA ACC AGT AGA TG-3'

ID Secuencia 39

5'-TCA ACA GAA TTC ATG TGC AAA GGT CAA GCT CCT TCC AAG GCC GAC GTG -3'

ID Secuencia 40

5'-AAA AGA AAG CTT TTA CTT TTC CTC GAG CTT GCG CTT GTA AAA CAC AAC-3'

ID Secuencia 41

```
1 ATGTGCAAAG GTCAAGCTCC TTCCAAGGCC GACGTGTTCC ACGCTGCGGG
51 GTACCGCCCG GTCGCCGGCA CGCCCGAGCC GCTGCCGCTG GAGCCCCGA
101 CGATCACGCT CAAGGACCTG CGCGCGGCGA TCCCGGCCCA CTGCTTTGAG
151 CGCAGCGCTG CCACTAGCTT TTACCATTTG GCCAAGAACC TTGCGATCTG
201 CGCCGGCGTG TTCGCCGTTG GCCTCAAGCT CGCGGCTGCC GACTTGCCCG
251 TCGCGGCCAA GCTGGTCGCG TGGCCCATCT ACTGTTTCGT CCAGGGCAGC
301 TACTTTACGG GCATCTGGGT CATTGCGCAC GAATGCGGCC ACCAGGCGTT
351 CTCGGCGTCC GAGATCCTCA ACGACACGGT CGGTATCATT CTTCACTCGC
401 TCCTCTTTGT GCCGTACCAC AGCTGGAAGA TCACGCACCG CCGCCACCAC
451 TCCAACACGG GCAGCTGCGA GAACGACGAG GTGTTTACGC CGACGCCGCG
501 GTCGTCGTC GAGGCCAAGC ACGACCACTC GTCCTCGAA GAGAGCCCGC
551 TCTACAACTT GTACGGCATC GTCATGATGC TTCTCGTGGG CTGGATGCCG
601 GGCTACCTCT TCTTCAACGC GACCGGCCCG ACCAAGTACG CTGGCCTCGC
651 CAAGTCGCAC TTCAACCCGT ACGCAGCCTT TTTCTCCCA AAGGAGCGCC
701 TCAGCATCTG GTGGAGCGAC CTCTGCTTCC TCGCGGCCTT GTACGGCTTT
751 GGCTACGGCG TCTCGGTCTT CGGCCTCCTC GATGTCGCCC GCCACTACAT
801 CGTGCCGTAC CTCATTTGCA ACGCGTACCT CGTGCTCATC ACGTACCTCC
851 AGCACACGGA TACGTACGTG CCCCACTTCC GCGCGACGA GTGGAActGG
901 CTGCGCGGCG CGCTCTGCAC CGTCGACCGC TCGTTGCGCG CGTGGATCGA
951 CAGCGCGATC CACCACATTG CCGACACGCA CGTGACGCAC CACATTTTCT
1001 CCAAGACGCC CTTCTACCAC GCGATCGAGG CGACCGACGC CATCACGCCC
1051 CTCCTCGGCA AGTACTACCT CATCGACCCG ACGCCGATCC CGCTGCGCT
1101 CTGGCGCTCG TTCACGCACT GCAAGTACGT CGAGGACGAC GGC AACGTTG
1151 TGTTTTACAA GCGCAAGCTC GAGGAAAAGT AA
```

FIG.9E

ID Secuencia 42

1 MCKGQAPSKA DVFHAAGYRP VAGTPEPLPL EPPTITLKDL RAAIPAHCFE
51 RSAATSFYHL AKNLAICAGV FAVGLKLAAA DLPLAACLVA WPIYWFVQGT
101 YFTGIWVIAH ECGHQAFSAS EILNDTVGII LHSLLFVPYH SWKITHRRHH
151 SNTGSCENDE VFTPTPRSVV EAKHDHSLLE ESPLYNLYGI VMMLLVGWMP
201 GYLFFNATGP TKYAGLAKSH FNPYAAFFLP KERLSIWWSL LCFLAALYGF
251 GYGVSFVGLL DVARHYIVPY LICNAYLVLV TYLQHTDTYV PHFRGDEWNW
301 LRGALCTVDR SFGAWIDSAI HHIADTHVTH HIFSKTPFYH AIEATDAITP
351 LLGKYYLIDP TPIPLALWRS FTHCKYVEDD GNVVFYKRKL EEK*

FIG.9F

ES 2 310 652 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Abbott Laboratories
Mukerji, Pradip
Huang, Yung-Sheng
Pereira, Suzette L.
- 10 <120> GENES DE DESATURASA, ENZIMAS CODIFICADAS POR ELLOS, Y SUS USOS
- 10 <130> 6884.US.01
- 15 <140> 10/060,793
<141> 2002-01-30
- <160> 60
- 20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
<211> 36
- 25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- <220>
- 30 <223> Cebador Directo RO1144
- <400> 1
- 35 atccgcgcccg ccatcccca gcaactgctgg gtcaag 36
- <210> 2
- 40 <211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
- <223> Cebador Directo RO1119
- <221> rasgo misc
- 50 <222> (21)...(21)
<223> y = t/u o c en la posición 21
- <221> rasgo misc
- 55 <222> (33)...(33)
<223> y = t/u o c en la posición 33
- 60 <400> 2
- gccctcttcg tcctcggcca ygactgcggc cayggctcgt tctcgc 45
- 65 <210> 3
<211> 45

ES 2 310 652 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Cebador Inverso RO1118

<221> rasgo misc

<222> (4)...(4)

10 <223> r = g o a en la posición 4

<221> rasgo misc

<222> (10)...(10)

15 <223> r = g o a en la posición 10

<221> rasgo misc

<222> (30)...(31)

20 <223> r = g o a en las posiciones 30-31

<221> rasgo misc

<222> (34)...(34)

25 <223> r = g o a en la posición 34

<221> rasgo misc

<222> (38)...(38)

30 <223> r = g o a en la posición 38

<221> rasgo misc

<222> (39)...(39)

35 <223> y = t/u o c en la posición 39

<221> rasgo misc

<222> (43)...(43)

40 <223> r = g o a en la posición 43

<400> 3

45

gagrtggtar tgggggatct gggggaagar rtgrtggryg acrtg 45

50

<210> 4

<211> 45

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Directo RO1121

60

<221> rasgo misc

<222> (9)...(9)

<223> y = t/u o c en la posición 9

65

<221> rasgo misc

<222> (27)...(27)

ES 2 310 652 T3

<223> y = t/u o c en la posición 27

<221> rasgo misc

5 <222> (36)...(36)

<223> y = t/u o c en la posición 36

<221> rasgo misc

10 <222> (39)...(39)

<223> y = t/u o c en la posición 39

<400> 4

15

ccctaccayg gctggcgcat ctcgcaycgc acccaycayc agaac 45

<210> 5

<211> 45

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Inverso RO1122

30 <221> rasgo misc

<222> (7)...(7)

<223> r = g o a en la posición 7

35 <221> rasgo misc

<222> (10)...(10)

<223> r = g o a en la posición 10

40 <221> rasgo misc

<222> (37)...(37)

<223> r = g o a en la posición 37

45 <400> 5

50 gttctgrtgr tgggtccgrt gcgagatgcg ccagccrtgg taggg 45

<210> 6

<211> 36

55 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Cebador Directo RO1146

<221> rasgo misc

65 <222> (13)...(13)

<223> s = g o c en la posición 13

ES 2 310 652 T3

<221> rasgo misc
<222> (19)...(19)
<223> k = g o t/u en la posición 19
5
<400> 6

10 ggctcgcact tcsaccccka ctcggacctc ttcgtc 36

<210> 7
<211> 36
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> Cebador Inverso RO1147

<221> rasgo misc
<222> (18)...(18)
25 <223> m = a o c en la posición 18

<221> rasgo misc
<222> (24)...(24)
30 <223> w = a o t/u en la posición 24

<400> 7
35
 gacgaagagg tccgagtmgg ggtwgaagtg cgagcc 36

40 <210> 8
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Cebador Inverso RO1148

50 <221> rasgo misc
<222> (9)...(9)
<223> k = g o t/u en la posición 9

55 <221> rasgo misc
<222> (30)... (30)
<223> w = a o t/u en la posición 30

60 <221> rasgo misc
<222> (32)...(32)
<223> s = g o c en la posición 32

65

ES 2 310 652 T3

<400> 8

5 gcgctggakg gtggtgaggg cgccgcggaw gsacgacca 39

<210> 9

<211> 45

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cebador Inverso RO1114

<221> rasgo misc

20 <222> (13)...(13)

<223> r = g o a en la posición 13

<221> rasgo misc

25 <222> (16)...(16)

<223> r = g o a en la posición 16

<221> rasgo misc

30 <222> (25)...(25)

<223> r = g o a en la posición 25

<221> rasgo misc

35 <222> (40)...(40)

<223> r = g o a en la posición 40

<221> rasgo misc

40 <222> (43)...(43)

<223> r = g o a en la posición 43

<400> 9

45 ctgggggaag agrtgtrtggga tgacrtgggt gccgatgtcr tgrtg 45

50 <210> 10

<211> 45

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Inverso R01116

60 <221> rasgo misc

<222> (12)... (12)

<223> y = t/u o c en la posición 12

65 <221> rasgo misc

<222> (16)...(16)

ES 2 310 652 T3

<223> r = g o a en la posición 16

<221> rasgo misc

5 <222> (22)...(22)

<223> r = g o a en la posición 22

<221> rasgo misc

10 <222> (33)...(33)

<223> k = g o t/u en la posición 33

<221> rasgo misc

15 <222> (42)...(43)

<223> r = g o at en las posiciones 42-43

<400> 10

20

ggtggcctcg aygagrtggt artgggggat ctkggggaag arrtg 45

25 <210> 11

<211> 45

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Inverso RO1118

35 <221> rasgo misc

<222> (4)...(4)

<223> r = g o a en la posición 4

40 <221> rasgo misc

<222> (10)...(10)

<223> r = g o a en la posición 10

45 <221> rasgo misc

<222> (30)...(31)

<223> r = g o a en las posiciones 30-31

50 <221> rasgo misc

<222> (34)...(34)

<223> r = g o a en la posición 34

55 <221> rasgo misc

<222> (38)... (38)

<223> r = g o a en la posición 38

60 <221> rasgo misc

<222> (39)...(39)

<223> y = t/u o c en la posición 39

65 <221> rasgo misc

ES 2 310 652 T3

<222> (43)...(43)

<223> r = g o a en la posición 43

5 <400> 11

gagrtggtar tgggggatct gggggaagar rtgrtggryg acrtg 45

10

<210> 12

<211> 25

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Directo RO1188

20

<400> 12

25 tacgcgtacc tcacgtactc gctcg

25

<210> 13

<211> 27

30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Directo RO1189

35

<400> 13

40

ttcttgcacc acaacgacga agcgacg

27

45 <210> 14

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Cebador Directo RO1190

55 <400> 14

ggagtggacg tacgtcaagg gcaac

25

60

<210> 15

<211> 26

<212> ADN

65

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 310 652 T3

<223> Cebador Directo RO1191

<400> 15

5

tcaagggcaa cctctcgagc gtcgac

26

10 <210> 16

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Cebador R0898

20

<400> 16

cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca g

31

25

<210> 17

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Cebador R0899

35

<400> 17

40

agcggataac aatttcacac aggaaacagc

30

<210> 18

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Cebador Inverso RO1185

50

<400> 18

55

ggtaaaagat ctcgctccttg tcgatggtgc

30

60 <210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65

<220>

ES 2 310 652 T3

<223> Cebador Inverso R01186
<400> 19
5 gtcaaagtgg ctcatcgtgc 20

10 <210> 20
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> Cebador Inverso RO1187
20 <400> 20

cgagcgagta cgtgaggtac gcgtac 26
25 <210> 21
<211> 45
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Cebador Directo RO1212

<400> 21
40 tcaacagaat tcatgaccga ggataagacg aaggctcgagt tcccg 45

<210> 22
45 <211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
50 <220>
<223> Cebador Inverso RO1213

<400> 22
55 aaaagaaagc ttcgcttcct agtcttagtc cgacttggcc ttggc 45
60 <210> 23
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
65 <220>

ES 2 310 652 T3

<223> Cebador Directo RO1221

<400> 23

5

tcaacaaagc ttatgaccga ggataagacg aaggctcgagt tcccg 45

10 <210> 24

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Cebador Inverso RO1222

20 <400> 24

aaaagagaat tccgcttcct agtcttagtc cgacttggcc ttggc 45

25

<210> 25

<211> 1077

<212> ADN

30

<213> *Saprolegnia diclina*

<400> 25

35

	atgactgagg	ataagacgaa	ggtcgagttc	ccgacgctca	cggagctcaa	gcaactcgatc	60
	ccgaacgcgt	gctttgagtc	gaacctcggc	ctctcgctct	actacacggc	ccgcgcgatc	120
	ttcaacgcgt	cggcctcggc	ggcgctgctc	tacggggcgc	gctcgacgcc	gttcattgcc	180
40	gataacgttc	tgctccacgc	gctcgtttgc	gccacctaca	tctacgtgca	ggcgctcadc	240
	ttctggggct	tcttcacggt	cggccacgac	tgcgccact	eggccttctc	gcgctaccac	300
	agcgtcaact	ttatcatcgg	ctgcatcatg	cactctgcga	ttttgacgcc	gttcgagagc	360

45

	tggcgcgatg	cgcaccgcca	ccaccacaag	aacacgggca	acattgataa	ggacgagatc	420
	ttttaccgcg	accggtcggg	caaggacctc	caggacgtgc	gccaatgggt	ctacacgctc	480
	ggcggtgcgt	ggtttgtcta	cttgaaggtc	gggtatgccc	cgcgacgat	gagccacttt	540
	gaccggtggg	acccgctcct	ccttcgccc	gcgtcgccc	tcatcgtgtc	gctcggcgtc	600
	tgggcccgcct	tcttcgccc	gtaecggtac	ctcacatact	cgctcggett	tgccgctatg	660
	ggcctctact	actatgcgce	gctctttgtc	tttgcttcgt	tctcgtcat	tacgaccttc	720
	ttgcaccaca	acgacgaagc	gacgcccgtg	tacggcgact	cggagtggac	gtacgtcaag	780
50	ggcaacctct	cgagcgtcga	ccgctcgtac	ggcggttcg	tggacaacct	gagccaccac	840
	attggcacgc	accaggtcca	ccacttgttc	ccgatcattc	cgcaactaaa	gctcaacgaa	900
	gccaccaagc	actttgcggc	cgcgtaccgc	cacctcgtgc	gcaggaacga	cgagcccatc	960
	atcacggcct	tcttcaagac	cgcgcacctc	tttgtcaact	acggcgctgt	gcccagagacg	1020
55	gcgcagatct	tcacgctcaa	agagtcggcc	gcggccgcca	aggccaagtc	ggactaa	1077

<210> 26

60 <211> 358

<212> PRT

<213> *Saprolegnia diclina*

65

ES 2 310 652 T3

<400> 26

5 Met Thr Glu Asp Lys Thr Lys Val Glu Phe Pro Thr Leu Thr Glu Leu
1 5 10
Lys His Ser Ile Pro Asn Ala Cys Phe Glu Ser Asn Leu Gly Leu Ser
20 25 30
Leu Tyr Tyr Thr Ala Arg Ala Ile Phe Asn Ala Ser Ala Ser Ala Ala
35 40 45
10 Leu Leu Tyr Ala Ala Arg Ser Thr Pro Phe Ile Ala Asp Asn Val Leu
50 55 60
Leu His Ala Leu Val Cys Ala Thr Tyr Ile Tyr Val Gln Gly Val Ile
65 70 75 80
Phe Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Cys Gly His Ser Ala Phe
85 90 95
15 Ser Arg Tyr His Ser Val Asn Phe Ile Ile Gly Cys Ile Met His Ser
100 105 110
Ala Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Arg Val Thr His Arg His His
115 120 125
20 His Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Lys Asp Glu Ile Phe Tyr Pro His
130 135 140
Arg Ser Val Lys Asp Leu Gln Asp Val Arg Gln Trp Val Tyr Thr Leu
145 150 155 160
Gly Gly Ala Trp Phe Val Tyr Leu Lys Val Gly Tyr Ala Pro Arg Thr
165 170 175
25 Met Ser His Phe Asp Pro Trp Asp Pro Leu Leu Leu Arg Arg Ala Ser
180 185 190
Ala Val Ile Val Ser Leu Gly Val Trp Ala Ala Phe Phe Ala Ala Tyr
195 200 205
30 Ala Tyr Leu Thr Tyr Ser Leu Gly Phe Ala Val Met Gly Leu Tyr Tyr
210 215 220
Tyr Ala Pro Leu Phe Val Phe Ala Ser Phe Leu Val Ile Thr Thr Phe
225 230 235 240
Leu His His Asn Asp Glu Ala Thr Pro Trp Tyr Gly Asp Ser Glu Trp
245 250 255
35 Thr Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala
260 265 270
Phe Val Asp Asn Leu Ser His His Ile Gly Thr His Gln Val His His
275 280 285
40 Leu Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Asn Glu Ala Thr Lys His
290 295 300

Phe Ala Ala Ala Tyr Pro His Leu Val Arg Arg Asn Asp Glu Pro Ile
305 310 315 320
Ile Thr Ala Phe Phe Lys Thr Ala His Leu Phe Val Asn Tyr Gly Ala
325 330 335
45 Val Pro Glu Thr Ala Gln Ile Phe Thr Leu Lys Glu Ser Ala Ala Ala
340 345 350
Ala Lys Ala Lys Ser Asp
355

50

<210> 27

<211> 1413

55 <212> ADN

<213> *Saprolegnia diclina*

60

65

ES 2 310 652 T3

<400> 27

```

5      atggcccccg agacggagct ccgccagcgc cagccgcgcg tcgccgagac gccggtggcc      60
      ggcaagaagg cctttacatg gcaggaggtc gcgcagcaca acacggcggc ctcggcctgg      120
      atcattatcc gcggcaaggt ctacgacgtg accgagtggg ccaacaagca ccccgggcggc      180
      cgcgagatgg tgctgctgca cgccggtcgc gaggccaccg acacgttcga ctcgtaccac      240
      ccgttcagcg acaaggccga gtcgatcttg aacaagtatg agattggcac gttcacgggc      300
10     gttggcgagt acttcaagaa gaacaacctc catccgcagg acggcttccc gggcctctgg      420
      cgcatgatgg tcgtgtttgc ggtcgccggc ctgccttgt acggcatgca cttttcgact      480
      atctttgcgc tgcagctcgc ggcgcggcgc ctctttggcg tctgccaggc gctgccgctg      540
      ctccacgtca tgcacgactc gtcgcaacgc tcgtacacca acatgccgtt cttccattac      600
      gtogtcggcc gctttgccat ggactggttt gccggcggct cgatgggtgc atgggtcaac      660
15     cagcacgtcg tgggccacca catctacag aacgtcgcgg gctcggacc ggatcttccg      720
      gtcaacatgg acggcgacat ccgccgcac gtgaaccgcc aggtgttcca gcccatgtac      780
      gcattccagc acatctacct tccgcgcgtc tatggcgtgc ttggcctcaa gttccgcac      840
      caggacttca ccgacaogtt cggtcgcac acgaacggcc cgatccgct caaccgcac      900
      gcgctctcga cgtggatggc catgatcagc tccaagtctg tctgggcctt ctaccgctg      960
20     taccttccgc ttgcccgtgct ccagatgcc atcaagacgt acctgcgat cttcttctc      1020
      gccgagtttg tcacgggctg gtacctcgcg ttcaacttcc aagtaagcca tgtctcgacc      1080
      gagtgcggct acctatgagg cgacgaggcc aagatggcgc tccaggacga gtgggagctc      1140
      tcgcaggtca agacgtcggg cgactacgcc catggctcgt ggatgacgac gttccttgcc      1200
      cggcgcgtca actaccaggt cgtgcaccac ttggtcccca gcgtgtcgca gtaccactac      1260
25     ccggcgatcg gcgccatcat cgtcgcagtc tgcaaggagt acaacatcaa gtaccctac      1320
      ttgccggact ttacggcggc gttcgtttgc cacttgaagc acctccgcaa catgggcca      1380
      cagggcatcg ccgccacgat ccacatgggc taa      1413

```

30 <210> 28

<211> 819

<212> ADN

35 <213> *Thraustochytrid* sp.

<400> 28

```

40     atggcaaaaca gcagcgtgtg ggatgatgtg gtgggcccgc tggagaccgg cgtggaccag      60
      tggatggatg gcgccaagcc gtacgcactc accgatgggc tcccgatgat ggacgtgtcc      120
      acctgctgg cattogaggt gggatacatg gccatgctgc tcttcggcat cccgatcatg      180
45     aagcagatgg agaagccttt tgagctcaag accatcaagc tcttgcaaa cttgtttctc      240
      ttcggacttt ccttgtacat gtgocgtggag acctccgcc aggetatcct cggaggctac      300
      aaagtgtttg gaaacgacat ggagaaggcc aacgagtctc atgctcaggg catgtctcgc      360
      atcgtgtacg tgttctgcgt gtccaaggca tacgagttct tggataccgc catcatgatc      420
      ctttgcaaga agttcaacca ggtttccttc ttgcatgtgt accaccatgc caccattttt      480
      gccatctggg gggtatcgc caagtacgct ccaggagggt atgctactt ttcagtgatc      540
50     ctcaactctt tcgtgcacac cgtcatgtac gcatactact tcttctcctc ccaagggttc      600
      gggttcgtga agccaatcaa gccgtacatc accacccttc agatgaccca gttcatggca      660

      atgcttgtgc agtccttcta cgactacctc ttcccatggg actaccaca ggctcttgtg      720
      cagcttcttg gagtgtacat gatcaccttg cttgccctct tcggcaactt ttttgtgcag      780
55     agctatctta aaaagccaaa aaagagcaag accaactaa      819

```

60 <210> 29

<211> 515

<212> PRT

<213> *Saprolegnia diclina*

65

ES 2 310 652 T3

<400> 29

5 Met Thr Val Gly Phe Asp Glu Thr Val Thr Met Asp Thr Val Arg Asn
 1 5 10 15
 His Asn Met Pro Asp Asp Ala Trp Cys Ala Ile His Gly Thr Val Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Thr Lys Phe Ser Lys Val His Pro Gly Gly Asp Ile Ile Met
 35 40 45
 10 Leu Ala Ala Gly Lys Glu Ala Thr Ile Leu Phe Glu Thr Tyr His Ile
 50 55 60
 Lys Gly Val Pro Asp Ala Val Leu Arg Lys Tyr Lys Val Gly Lys Leu
 65 70 75 80
 Pro Gln Gly Lys Lys Gly Glu Thr Ser His Met Pro Thr Gly Leu Asp
 85 90 95
 15 Ser Ala Ser Tyr Tyr Ser Trp Asp Ser Glu Phe Tyr Arg Val Leu Arg
 100 105 110
 Glu Arg Val Ala Lys Lys Leu Ala Glu Pro Gly Leu Met Gln Arg Ala
 115 120 125
 20 Arg Met Glu Leu Trp Ala Lys Ala Ile Phe Leu Leu Ala Gly Phe Trp
 130 135 140
 Gly Ser Leu Tyr Ala Met Cys Val Leu Asp Pro His Gly Gly Ala Met
 145 150 155 160
 Val Ala Ala Val Thr Leu Gly Val Phe Ala Ala Phe Val Gly Thr Cys
 165 170 175
 25 Ile Gln His Asp Gly Ser His Gly Ala Phe Ser Lys Ser Arg Phe Met
 180 185 190
 Asn Lys Ala Ala Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met
 195 200 205
 Thr Trp Glu Met Gln His Val Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Leu
 210 215 220
 30 Ile Glu Met Glu Asn Gly Leu Ala Lys Val Lys Gly Ala Asp Val Asp
 225 230 235 240
 Pro Lys Lys Val Asp Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe Ser Thr Tyr
 245 250 255
 35 Pro Met Leu Arg Leu His Pro Trp His Arg Gln Arg Phe Tyr His Lys
 260 265 270
 Phe Gln His Leu Tyr Ala Pro Leu Ile Phe Gly Phe Met Thr Ile Asn
 275 280 285
 Lys Val Ile Ser Gln Asp Val Gly Val Val Leu Arg Lys Arg Leu Phe
 290 295 300
 40 Gln Ile Asp Ala Asn Cys Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Asn Val Ala Arg
 305 310 315 320
 Phe Trp Ile Met Lys Leu Leu Thr Thr Leu Tyr Met Val Ala Leu Pro
 325 330 335
 Met Tyr Met Gln Gly Pro Ala Gln Gly Leu Lys Leu Phe Phe Met Ala
 340 345 350
 45 His Phe Thr Cys Gly Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His
 355 360 365
 Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val Lys Gly Val
 370 375 380
 50 Met Ala Pro Pro Arg Thr Val His Gly Val Thr Pro Met Gln Val Thr
 385 390 395 400
 Gln Lys Ala Leu Ser Ala Ala Glu Ser Thr Lys Ser Asp Ala Asp Lys
 405 410 415
 Thr Thr Met Ile Pro Leu Asn Asp Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr
 420 425 430
 55 Ser Val Asn Trp Ala Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly
 435 440 445
 Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Cys Phe Pro Gln Asn Pro His
 450 455 460
 60 Thr Val Asn Val Tyr Ile Ser Gly Ile Val Lys Glu Thr Cys Glu Glu
 465 470 475 480
 Tyr Gly Val Pro Tyr Gln Ala Glu Ile Ser Leu Phe Ser Ala Tyr Phe
 485 490 495
 Lys Met Leu Ser His Leu Arg Thr Leu Gly Asn Glu Asp Leu Thr Ala
 500 505 510
 65 Trp Ser Thr
 515

ES 2 310 652 T3

<210> 30
<211> 51
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Directo R0967
10

<221> rasgo misc
<222> (4)...(4)
<223> s = g o c en la posición 4
15

<221> rasgo misc
<222> (12)...(12)
<223> s = g o c en la posición 12
20

<221> rasgo misc
<222> (30)... (30)
<223> s = g o c en la posición 30
25

<221> rasgo misc
<222> (31)...(31)
<223> k = g o t/u en la posición 31
30

<221> rasgo misc
<222> (32)...(32)
<223> s = g o c en la posición 32
35

<400> 30

40 ccgsagttca csatcaagga gatccgogas kscatcccgg
 cccactgctt c

45 <210> 31
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
50

<220>
<223> Cebador Inverso R0968

55 <221> rasgo misc
<222> (2)...(2)
<223> r = g o a en la posición 2

60 <221> rasgo misc
<222> (3)...(3)
<223> s = g o c en la posición 3

65 <221> rasgo misc
<222> (12)...(12)

51

ES 2 310 652 T3

<223> k = g o t/u en la posición 12

<221> rasgo misc

5 <222> (17)...(17)

<223> w = a o t/u en la posición 17

<221> rasgo misc

10 <222> (18)... (18)

<223> m = a o c en la posición 18

<221> rasgo misc

15 <222> (19)... (19)

<223> s = g o c en la posición 19

<221> rasgo misc

20 <222> (41)...(41)

<223> w = a o t/u en la posición 41

<221> rasgo misc

25 <222> (42)... (42)

<223> r = g o a en la posición 42

30 <400> 31

grscttcttg akgtggwmsg tggcctcctc ggcgtggtag wrcggcat 48

35 <210> 32

<211> 45

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Directo RO964

45 <221> rasgo misc

<222> (3)...(4)

<223> s = g o c en las posiciones 3-4

50 <221> rasgo misc

<222> (25)...(25)

<223> r = g o a en la posición 25

55 <221> rasgo misc

<222> (36)...(36)

<223> s = g o c en la posición 36

60 <400> 32

ccsstctact gggcctgccca gggtrtcgtc ctcacsggtg tctgg 45

65

<210> 33

ES 2 310 652 T3

<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> Cebador Directo R0965
10 <221> rasgo misc
<222> (3)...(4)
<223> s = g o c en las posiciones 3-4
15 <221> rasgo misc
<222> (16)...(16)
<223> r = g o a en la posición 16
20 <221> rasgo misc
<222> (17)...(17)
<223> y = t/u o c en la posición 17
25 <221> rasgo misc
<222> (18)...(18)
<223> s = g o c en la posición 18
30 <221> rasgo misc
<222> (25)...(25)
<223> r = g o a en la posición 25
35 <221> rasgo misc
<222> (31)...(31)
<223> k = g o t/u en la posición 31
40 <221> rasgo misc
<222> (33)...(33)
<223> y = t/u o c en la posición 33
45 <221> rasgo misc
<222> (36)...(36)
<223> s = g o c en la posición 36
50
<400> 33

55 ccsstctact ggatcrysca gggtrtcgtc kgyacsggtg tctgg 45

<210> 34
<211> 45
60 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
65 <223> Cebador Inverso RO966
<221> rasgo misc

ES 2 310 652 T3

<222> (19)...(19)

<223> s = g o c en la posición 19

5 <221> rasgo misc

<222> (20)...(21)

<223> m = a o c en las posiciones 20-21

10 <221> rasgo misc

<222> (30)...(30)

<223> r = g o a en la posición 30

15 <400> 34

ggcgtggtag tgcggcatsm mcgagaagar gtggtgggcg acgtg 45

20

<210> 35

<211> 29

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Directo RO975

30

<400> 35

35 cacgtacctc cagcacacgg acacctacg

29

<210> 36

<211> 27

40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

45

<223> Cebador Directo R0976

<400> 36

50

gatcgacagc gcgatccacc acattgc

27

<210> 37

55

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

60

<220>

<223> Cebador Inverso RO977

65

ES 2 310 652 T3

<400> 37

5 caaatggtaa aagctagtgg cagcgctgc 29

<210> 38

<211> 29

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cebador Inverso RO978

<400> 38

20 agtacgtgcc ctggacgaac cagtagatg 29

<210> 39

25 <211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Cebador Directo RO1051

<400> 39

35 tcaacagaat tcatgtgcaa aggtcaagct ccttccaagg cgcacgtg 48

40 <210> 40

<211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Cebador Inverso RO1057

50 <400> 40

55 aaaagaaagc ttttactttt cctcgagctt gcgcttgtaa aacacaac 48

<210> 41

<211> 1182

60 <212> ADN

<213> *Saprolegnia diclina*

65

ES 2 310 652 T3

<400> 41

```

5      atgtgcaaag gtcaagctcc ttccaaggcc gacgtgttcc acgctgcggg gtaccgcccc      60
      gtcgcccggca cgcccagacc gctgcccgtg gagccccga cgatcacgct caaggacctg      120
      cgcgccggcga tcccggccca ctgctttgag cgcagcgtg cactagctt ttaccatttg      180
      gccaaagaacc ttgcatctg cgccggcgtg ttgcccgtt gcctcaagct cgcggctgcc      240
10     gacttgccgc tcgcccga g6tggtcgcg tggccatct actggttcgt ccagggcacg      300
      tactttacgg gcatctgggt cattgcccac gaatcgggcc accaggcgtt ctggcgctcc      360
      gagatcctca acgacacggg cgggtatcatt cttcactcgc tcctctttgt gccgtaccac      420
      agctggaaga tcacgcaccg ccgccaccac tccaacacgg gcagctgcga gaacgacgag      480
      gtgtttacgc cgacgccgcg gtccgtcgtc gaggccaagc acgaccactc gtcctcga      540
15     gagagcccgc tctacaacct gtacggcatc gtcgatgac ttctcgtggg ctggatgccg      600
      ggctacctct tcttcaacgc gaccggcccg accaagtaag ctggcctcgc caagtcgcac      660
      ttcaaccctg acgcagcctt tttcctcca aaggagcggc tcagcatctg gtggagcgac      720
      ctctgcttcc tcgcccctt gtacggctt ggctacggcg tctcggctt cggcctcctc      780
      gatgtcggcc gccactacat cgtgccgtac ctcatttgca acgcgtacct cgtgctcacc      840
20     acgtacctcc agcacacgga tacgtacgtg cccacttcc gggcgacga gtggaactgg      900
      ctgcccggcg cgctctgcac cgtcgaccgc tcgttcggcg cgtggatcga cagcgcgatc      960
      caccacattg ccgacacgca cgtgacgcac cacattttct ccaagacgcc cttctaccac      1020
      gcgatcgagg cgaccgacgc catcacgccc ctcctcggca agtactacct catcgacctg      1080
      acgccgatcc cgctggcgtc ctggcgtcgt ttcacgcact gcaagtacgt cgaggacgac      1140
25     gcgcaagctg tgttttacaa gcgcaagctc gaggaaaagt aa      1182

```

<210> 42

30 <211> 393

<212> PRT

<213> *Saprolegnia diclina*

35 <400> 42

```

40     Met Cys Lys Gly Gln Ala Pro Ser Lys Ala Asp Val Phe His Ala Ala
      1           5           10          15
      Gly Tyr Arg Pro Val Ala Gly Thr Pro Glu Pro Leu Pro Leu Glu Pro

```

45

50

55

60

65

ES 2 310 652 T3

```

                20                25                30
Pro Thr Ile Thr Leu Lys Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro Ala His Cys
      35                40                45
Phe Glu Arg Ser Ala Ala Thr Ser Phe Tyr His Leu Ala Lys Asn Leu
  5  50                55                60
Ala Ile Cys Ala Gly Val Phe Ala Val Gly Leu Lys Leu Ala Ala Ala
  65                70                75                80
Asp Leu Pro Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Trp Pro Ile Tyr Trp Phe
      85                90                95
10  Val Gln Gly Thr Tyr Phe Thr Gly Ile Trp Val Ile Ala His Glu Cys
      100               105               110
Gly His Gln Ala Phe Ser Ala Ser Glu Ile Leu Asn Asp Thr Val Gly
      115                120                125
Ile Ile Leu His Ser Leu Leu Phe Val Pro Tyr His Ser Trp Lys Ile
15  130                135                140
Thr His Arg Arg His His Ser Asn Thr Gly Ser Cys Glu Asn Asp Glu
  145                150                155                160
Val Phe Thr Pro Thr Pro Arg Ser Val Val Glu Ala Lys His Asp His
      165                170                175
20  Ser Leu Leu Glu Glu Ser Pro Leu Tyr Asn Leu Tyr Gly Ile Val Met
      180                185                190
Met Leu Leu Val Gly Trp Met Pro Gly Tyr Leu Phe Phe Asn Ala Thr
      195                200                205
Gly Pro Thr Lys Tyr Ala Gly Leu Ala Lys Ser His Phe Asn Pro Tyr
25  210                215                220
Ala Ala Phe Phe Leu Pro Lys Glu Arg Leu Ser Ile Trp Trp Ser Asp
  225                230                235                240
Leu Cys Phe Leu Ala Ala Leu Tyr Gly Phe Gly Tyr Gly Val Ser Val
      245                250                255
Phe Gly Leu Leu Asp Val Ala Arg His Tyr Ile Val Pro Tyr Leu Ile
30  260                265                270
Cys Asn Ala Tyr Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr Asp Thr
      275                280                285
Tyr Val Pro His Phe Arg Gly Asp Glu Trp Asn Trp Leu Arg Gly Ala
  290                295                300
35  Leu Cys Thr Val Asp Arg Ser Phe Gly Ala Trp Ile Asp Ser Ala Ile
  305                310                315                320
His His Ile Ala Asp Thr His Val Thr His His Ile Phe Ser Lys Thr
      325                330                335
Pro Phe Tyr His Ala Ile Glu Ala Thr Asp Ala Ile Thr Pro Leu Leu
40  340                345                350
Gly Lys Tyr Tyr Leu Ile Asp Pro Thr Pro Ile Pro Leu Ala Leu Trp
      355                360                365
Arg Ser Phe Thr His Cys Lys Tyr Val Glu Asp Asp Gly Asn Val Val
  370                375                380
45  Phe Tyr Lys Arg Lys Leu Glu Glu Lys
      385                390

```

```

50 <210> 43
   <211> 393
   <212> PRT
55 <213> Saprolegnia diclina
   <400> 43

```

```

60
Met Cys Lys Gly Gln Ala Pro Ser Lys Ala Asp Val Phe His Ala Ala
  1      5      10
Gly Tyr Arg Pro Val Ala Gly Thr Pro Glu Pro Leu Pro Leu Glu Pro
65

```

ES 2 310 652 T3

```

                20                25                30
Pro Thr Ile Thr Leu Lys Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro Ala His Cys
                35                40                45
5  Phe Glu Arg Ser Ala Ala Thr Ser Phe Tyr His Leu Ala Lys Asn Leu
   50                55                60
Ala Ile Cys Ala Gly Val Phe Ala Val Gly Leu Lys Leu Ala Ala Ala
65                70                75                80
Asp Leu Pro Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Trp Pro Ile Tyr Trp Phe
                85                90                95
10 Val Gln Gly Thr Tyr Phe Thr Gly Ile Trp Val Ile Ala His Glu Cys
   100                105                110
Gly His Gln Ala Phe Ser Ala Ser Glu Ile Leu Asn Asp Thr Val Gly
   115                120                125
Ile Ile Leu His Ser Leu Leu Phe Val Pro Tyr His Ser Trp Lys Ile
15   130                135                140
Thr His Arg Arg His His Ser Asn Thr Gly Ser Cys Glu Asn Asp Glu
145                150                155                160
Val Phe Thr Pro Thr Pro Arg Ser Val Val Glu Ala Lys His Asp His
20   165                170                175
Ser Leu Leu Glu Glu Ser Pro Leu Tyr Asn Leu Tyr Gly Ile Val Met
   180                185                190
Met Leu Leu Val Gly Trp Met Pro Gly Tyr Leu Phe Phe Asn Ala Thr
   195                200                205
Gly Pro Thr Lys Tyr Ala Gly Leu Ala Lys Ser His Phe Asn Pro Tyr
25   210                215                220
Ala Ala Phe Phe Leu Pro Lys Glu Arg Leu Ser Ile Trp Trp Ser Asp
225                230                235                240
Leu Cys Phe Leu Ala Ala Leu Tyr Gly Phe Gly Tyr Gly Val Ser Val
   245                250                255
Phe Gly Leu Leu Asp Val Ala Arg His Tyr Ile Val Pro Tyr Leu Ile
30   260                265                270
Cys Asn Ala Tyr Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr Asp Thr
   275                280                285
Tyr Val Pro His Phe Arg Gly Asp Glu Trp Asn Trp Leu Arg Gly Ala
   290                295                300
35 Leu Cys Thr Val Asp Arg Ser Phe Gly Ala Trp Ile Asp Ser Ala Ile
   305                310                315
His His Ile Ala Asp Thr His Val Thr His His Ile Phe Ser Lys Thr
   325                330                335
Pro Phe Tyr His Ala Ile Glu Ala Thr Asp Ala Ile Thr Pro Leu Leu
40   340                345                350
Gly Lys Tyr Tyr Leu Ile Asp Pro Thr Pro Ile Pro Leu Ala Leu Trp
   355                360                365
Arg Ser Phe Thr His Cys Lys Tyr Val Glu Asp Asp Gly Asn Val Val
   370                375                380
45 Phe Tyr Lys Arg Lys Leu Glu Glu Lys
   385                390

```

- 50 <210> 44
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> *Synechocystis* sp.
- 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (315)...(315)
- 60 <223> Xaa = Desconocido u Otro en la posición 315
- <221> VARIANTE
 <222> (331)...(331)
- 65 <223> Xaa = Desconocido u Otro en la posición 331

ES 2 310 652 T3

<400> 44

5 Tyr Phe Phe Leu Asp Val Gly Leu Ile Ala Gly Phe Tyr Ala Leu Ala
1 5 10 15
Ala Tyr Leu Asp Ser Trp Phe Phe Tyr Pro Ile Phe Trp Leu Ile Gln
20 25 30
Gly Thr Leu Phe Trp Ser Leu Phe Val Val Gly His Asp Cys Gly His
35 40 45
10 Gly Ser Phe Ser Lys Ser Lys Thr Leu Asn Asn Trp Ile Gly His Leu
50 55 60
Ser His Thr Pro Ile Leu Val Pro Tyr His Gly Trp Arg Ile Ser His
65 70 75 80
15 Arg Thr His His Ala Asn Thr Gly Asn Ile Asp Thr Asp Glu Ser Trp
85 90 95
Tyr Pro Val Ser Glu Gln Lys Tyr Asn Gln Met Ala Trp Tyr Glu Lys
100 105 110
Leu Leu Arg Phe Tyr Leu Pro Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Tyr Leu Phe
115 120 125
20 Arg Arg Ser Pro Asn Arg Gln Gly Ser His Phe Met Pro Gly Ser Pro
130 135 140
Leu Phe Arg Pro Gly Glu Lys Ala Ala Val Leu Thr Ser Thr Phe Ala
145 150 155 160
Leu Ala Ala Phe Val Gly Phe Leu Gly Phe Leu Thr Trp Gln Phe Gly
165 170 175
25 Trp Leu Phe Leu Leu Lys Phe Tyr Val Ala Pro Tyr Leu Val Phe Val
180 185 190
Val Trp Leu Asp Leu Val Thr Phe Leu His His Thr Glu Asp Asn Ile
195 200 205
30 Pro Trp Tyr Arg Gly Asp Asp Trp Tyr Phe Leu Lys Gly Ala Leu Ser
210 215 220
Thr Ile Asp Arg Asp Tyr Gly Phe Ile Asn Pro Ile His His Asp Ile
225 230 235 240
Gly Thr His Val Ala His His Ile Phe Ser Asn Met Pro His Tyr Lys
245 250 255
35 Leu Arg Arg Ala Thr Glu Ala Ile Lys Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr
260 265 270
Arg Tyr Ser Asp Glu Pro Ile Trp Gln Ala Phe Phe Lys Ser Tyr Trp
275 280 285
40 Ala Cys His Phe Val Pro Asn Gln Gly Ser Gly Val Tyr Tyr Gln Ser
290 295 300
Pro Ser Asn Gly Gly Tyr Gln Lys Lys Pro Xaa Leu Ile Leu Ile Glu
305 310 315 320
Ser Asn Gln His Arg Glu Gly Arg Gln Tyr Xaa Met Val Leu Leu Pro
325 330 335
45 Ser Asp Arg Leu Met Arg Ser Met Glu Glu Val Lys Gln Ser His Ser
340 345 350
Lys Arg Ser Ala Leu Asn Gln
355

50

<210> 45

<211> 358

<212> PRT

55

<213> *Saprolegnia diclina*

60

65

ES 2 310 652 T3

<400> 45

5 Met Thr Glu Asp Lys Thr Lys Val Glu Phe Pro Thr Leu Thr Glu Leu
 1 5 10 15
 Lys His Ser Ile Pro Asn Ala Cys Phe Glu Ser Asn Leu Gly Leu Ser
 20 25 30
 Leu Tyr Tyr Thr Ala Arg Ala Ile Phe Asn Ala Ser Ala Ser Ala Ala
 35 40 45
 10 Leu Leu Tyr Ala Ala Arg Ser Thr Pro Phe Ile Ala Asp Asn Val Leu
 50 55 60
 Leu His Ala Leu Val Cys Ala Thr Tyr Ile Tyr Val Gln Gly Val Ile
 65 70 75 80
 Phe Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Cys Gly His Ser Ala Phe
 85 90 95
 15 Ser Arg Tyr His Ser Val Asn Phe Ile Ile Gly Cys Ile Met His Ser
 100 105 110
 Ala Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Arg Val Thr His Arg His His
 115 120 125
 20 His Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Lys Asp Glu Ile Phe Tyr Pro His
 130 135 140
 Arg Ser Val Lys Asp Leu Gln Asp Val Arg Gln Trp Val Tyr Thr Leu
 145 150 155 160
 Gly Gly Ala Trp Phe Val Tyr Leu Lys Val Gly Tyr Ala Pro Arg Thr
 165 170 175
 25 Met Ser His Phe Asp Pro Trp Asp Pro Leu Leu Leu Arg Arg Ala Ser
 180 185 190
 Ala Val Ile Val Ser Leu Gly Val Trp Ala Ala Phe Phe Ala Ala Tyr
 195 200 205
 30 Ala Tyr Leu Thr Tyr Ser Leu Gly Phe Ala Val Met Gly Leu Tyr Tyr
 210 215 220
 Tyr Ala Pro Leu Phe Val Phe Ala Ser Phe Leu Val Ile Thr Thr Phe
 225 230 235 240
 Leu His His Asn Asp Glu Ala Thr Pro Trp Tyr Gly Asp Ser Glu Trp
 245 250 255
 35 Thr Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala
 260 265 270
 Phe Val Asp Asn Leu Ser His His Ile Gly Thr His Gln Val His His
 275 280 285
 40 Leu Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Asn Glu Ala Thr Lys His
 290 295 300
 Phe Ala Ala Ala Tyr Pro His Leu Val Arg Arg Asn Asp Glu Pro Ile
 305 310 315 320
 Ile Thr Ala Phe Phe Lys Thr Ala His Leu Phe Val Asn Tyr Gly Ala
 325 330 335
 45 Val Pro Glu Thr Ala Gln Ile Phe Thr Leu Lys Glu Ser Ala Ala Ala
 340 345 350
 Ala Lys Ala Lys Ser Asp
 355

50

<210> 46

<211> 409

<212> PRT

55

<213> *Caenorhabditis elegans*

<220>

60

<221> VARIANTE

<222> (389)...(389)

<223> Xaa = Desconocido u Otro en la posición 389

65

ES 2 310 652 T3

<400> 46

```

5      Val Thr Gly Gly Asp Val Leu Val Asp Ala Arg Ala Ser Leu Glu Glu
      1      5      10      15      20      25      30      35      40      45
Lys Glu Ala Pro Arg Asp Val Asn Ala Asn Thr Lys Gln Ala Thr Thr
      20      25      30
Glu Glu Pro Arg Ile Gln Leu Pro Thr Val Asp Ala Phe Arg Arg Ala
      35      40      45
10     Ile Pro Ala His Cys Phe Glu Arg Asp Leu Val Lys Ser Ile Arg Tyr
      50      55      60
Leu Val Gln Asp Phe Ala Ala Leu Thr Ile Leu Tyr Phe Ala Leu Pro
      65      70      75      80
15     Ala Phe Glu Tyr Phe Gly Leu Phe Gly Tyr Leu Val Trp Asn Ile Phe
      85      90      95
Met Gly Val Phe Gly Phe Ala Leu Phe Val Val Gly His Asp Cys Leu
      100      105
His Gly Ser Phe Ser Asp Asn Gln Asn Leu Asn Asp Phe Ile Gly His
      115      120      125
20     Ile Ala Phe Ser Pro Leu Phe Ser Pro Tyr Phe Pro Trp Gln Lys Ser
      130      135      140
His Lys Leu His His Ala Phe Thr Asn His Ile Asp Lys Asp His Gly
      145      150      155      160
His Val Trp Ile Gln Asp Lys Asp Trp Glu Ala Met Pro Ser Trp Lys
      165      170      175
25     Arg Trp Phe Asn Pro Ile Pro Phe Ser Gly Trp Leu Lys Trp Phe Pro
      180      185      190
Val Tyr Thr Leu Phe Gly Phe Cys Asp Gly Ser His Phe Trp Pro Tyr
      195      200      205
30     Ser Ser Leu Phe Val Arg Asn Ser Asp Arg Val Gln Cys Val Ile Ser
      210      215      220
Gly Ile Cys Cys Cys Val Cys Ala Tyr Ile Ala Leu Thr Ile Ala Gly
      225      230      235      240
Ser Tyr Ser Asn Trp Phe Trp Tyr Tyr Trp Val Pro Leu Ser Phe Phe
      245      250      255
35     Gly Leu Met Leu Val Ile Val Thr Tyr Leu Gln His Val Asp Asp Val
      260      265      270
Ala Glu Val Tyr Glu Ala Asp Glu Trp Ser Phe Val Arg Gly Gln Thr
      275      280      285
40     Gln Thr Ile Asp Arg Tyr Tyr Gly Leu Gly Leu Asp Thr Thr Met His
      290      295      300
His Ile Thr Asp Gly His Val Ala His His Phe Phe Asn Lys Ile Pro
      305      310      315      320
His Tyr His Leu Ile Glu Ala Thr Glu Gly Val Lys Lys Val Leu Glu
      325      330      335
45     Pro Leu Ser Asp Thr Gln Tyr Gly Tyr Lys Ser Gln Val Asn Tyr Asp
      340      345      350
Phe Phe Ala Arg Phe Leu Trp Phe Asn Tyr Lys Leu Asp Tyr Leu Val
      355      360      365
His Lys Thr Ala Gly Ile Met Gln Phe Arg Thr Thr Leu Glu Glu Lys
      370      375      380
50     Ala Lys Ala Lys Xaa Lys Asn Ile Pro Cys Arg Ser Arg Val Gln Gln
      385      390      395      400
Gln Leu Leu Arg Phe His Arg Phe Cys
      405

```

55

<210> 47

<211> 333

60 <212> PRT

<213> *Saprolegnia diclina*

65

ES 2 310 652 T3

<400> 47

```

5      Met Cys Lys Gly Gln Ala Pro Ser Lys Ala Asp Val Phe His Ala Ala
      1      5      10      15
      Gly Tyr Arg Pro Val Ala Gly Thr Pro Glu Pro Leu Pro Leu Glu Pro
      20      25      30
      Pro Thr Ile Thr Leu Lys Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro Ala His Cys
      35      40      45
10     Phe Glu Arg Ser Ala Ala Thr Ser Phe Tyr His Leu Ala Lys Asn Leu
      50      55      60
      Ala Ile Cys Ala Gly Val Phe Ala Val Gly Leu Lys Leu Ala Ala Ala
      65      70      75      80
      Asp Leu Pro Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Trp Pro Ile Tyr Trp Phe
15     Val Gln Gly Thr Tyr Phe Thr Gly Ile Trp Val Ile Ala His Glu Cys
      85      90      95
      Gly His Gln Ala Phe Ser Ala Ser Glu Ile Leu Asn Asp Thr Val Gly
      100      105      110
20     Ile Ile Leu His Ser Leu Leu Phe Val Pro Tyr His Ser Trp Lys Ile
      115      120      125
      Thr His Arg Arg His His Ser Asn Thr Gly Ser Cys Glu Asn Asp Glu
145    150      155      160
      Val Phe Thr Pro Thr Pro Arg Ser Val Val Glu Ala Lys His Asp His
25     Ser Leu Leu Glu Ser Pro Leu Tyr Asn Leu Tyr Gly Ile Val Met
      165      170      175
      Met Leu Leu Val Gly Trp Met Pro Gly Tyr Leu Phe Phe Asn Ala Thr
      180      185      190
      Gly Pro Thr Lys Tyr Ala Gly Leu Ala Lys Ser His Phe Asn Pro Tyr
30     Ala Ala Phe Phe Leu Pro Lys Glu Arg Leu Ser Ile Trp Trp Ser Asp
      195      200      205
      Leu Cys Phe Leu Ala Ala Leu Tyr Gly Phe Gly Tyr Gly Val Ser Val
      210      215      220
35     Phe Gly Leu Leu Asp Val Ala Arg His Tyr Ile Val Pro Tyr Leu Ile
      225      230      235
      Cys Asn Ala Tyr Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr Asp Thr
      240      245      250
      Thr Pro Leu Leu Gly Lys Tyr Tyr Leu Ile Asp Pro Thr Pro Ile Pro
40     Leu Ala Leu Trp Arg Ser Phe Thr His Cys Lys Tyr Val Glu Asp Asp
      255      260      265
      Gly Asn Val Val Phe Tyr Lys Arg Lys Leu Glu Glu Lys
      270      275      280
      285
      290      295
      300
      305      310      315
      320
      325      330

```

45

<210> 48

<211> 412

50

<212> PRT

<213> *Gossypium hirsutum*

55

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = Desconocido u Otro en la posición 9

60

<221> VARIANTE

<222> (403)...(403)

<223> Xaa = Desconocido u Otro en la posición 403

65

ES 2 310 652 T3

<400> 48

5 Leu Arg Val Ser Ser Thr Trp Arg Xaa Thr Ala Phe Phe Lys Ala Ser
 1 5 10 15
 Lys Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Pro Ile Asp Gly Ile Lys Glu Glu
 20 25 30
 10 Asn Arg Gly Ser Val Asn Arg Val Pro Ile Glu Lys Pro Pro Phe Thr
 35 40 45
 Leu Gly Gln Ile Lys Gln Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Arg Arg Ser
 50 55 60
 Leu Leu Arg Ser Phe Ser Tyr Val Val His Asp Leu Cys Leu Ala Ser
 65 70 75 80
 15 Phe Phe Tyr Tyr Ile Ala Thr Ser Tyr Phe His Phe Leu Pro Gln Pro
 85 90 95
 Phe Ser Tyr Ile Ala Trp Pro Val Tyr Trp Val Leu Gln Gly Cys Ile
 100 105 110
 Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Trp Gly His His Ala Phe
 115 120 125
 20 Arg Asp Tyr Gln Trp Val Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Leu His Ser
 130 135 140
 Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Ile Ser His Arg Arg His
 145 150 155 160
 His Ser Asn Thr Gly Ser Met Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys
 165 170 175
 25 Pro Lys Ser Lys Leu Ser Cys Phe Ala Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Pro
 180 185 190
 Gly Arg Val Leu Ser Leu Val Val Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro Met
 195 200 205
 30 Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Tyr Tyr Asp Arg Leu Ala Ser
 210 215 220
 His Tyr Asn Pro Tyr Gly Pro Ile Tyr Ser Asp Arg Glu Arg Leu Gln
 225 230 235 240
 Val Tyr Ile Ser Asp Thr Gly Ile Phe Ala Val Ile Tyr Val Leu Tyr
 245 250 255
 35 Lys Ile Ala Ala Thr Lys Gly Leu Ala Trp Leu Leu Cys Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Ala Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu
 275 280 285
 40 Gln His Thr His Ser Ala Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Asp
 290 295 300
 Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ser Thr Met Asp Arg Asp Phe Gly Val Leu
 305 310 315 320
 Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His Leu
 325 330 335
 45 Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala Ile
 340 345 350
 Lys Pro Ile Leu Gly Lys Tyr Tyr Pro Phe Asp Gly Thr Pro Ile Tyr
 355 360 365
 Lys Ala Met Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Leu Tyr Val Glu Pro Asp
 370 375 380
 50 Val Gly Gly Gly Gly Gly Ser Lys Gly Val Phe Trp Tyr Arg Asn
 385 390 395 400
 Lys Phe Xaa Arg Pro Thr Asn Cys Leu Ile Ala Gly

55 405 410

60 <210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Motivo Proteico 1 del Ejemplo 3

ES 2 310 652 T3

- <223> Xaa = Q o K en la posición 5
- <221> VARIANTE
- 5 <222> (12)...(12)
- <223> Xaa = V o I en la posición 12
- <400> 55
- 10
- | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Xaa | Phe | Pro | Xaa | Ile | Pro | His | Tyr | His | Leu | Xaa | Glu | Ala | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |
- 15 <210> 56
- <211> 15
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Motivo Proteico 8 del Ejemplo 3
- 25 <221> VARIANTE
- <222> (3)...(3)
- <223> Xaa = A o I en la posición 3
- 30 <221> VARIANTE
- <222> (6)...(6)
- <223> Xaa = L o F en la posición 6
- 35 <400> 56
- | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Val | Xaa | His | His | Xaa | Phe | Pro | Gln | Ile | Pro | His | Tyr | His | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |
- 40
- <210> 57
- 45 <211> 17
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
- <223> Motivo Proteico 1 del Ejemplo 7
- <221> VARIANTE
- 55 <222> (2)...(2)
- <223> Xaa = N o E en la posición 2
- <221> VARIANTE
- 60 <222> (10)...(10)
- <223> Xaa = D o E en la posición 10
- <221> VARIANTE
- 65 <222> (11)...(11)
- <223> Xaa = A o C en la posición 11

ES 2 310 652 T3

<400> 57

```

5      Pro Xaa Phe Thr Ile Lys Glu Ile Arg Xaa Xaa Ile Pro Ala His Cys
      1           5           10           15
      Phe
  
```

<210> 58

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Motivo Proteico 2 del Ejemplo 7

<221> VARIANTE

20 <222> (3)...(3)

<223> Xaa = H o F en la posición 3

<221> VARIANTE

25 <222> (11)...(11)

<223> Xaa = V o Y en la posición 11

<221> VARIANTE

30 <222> (13)...(13)

<223> Xaa = I o L en la posición 13

<221> VARIANTE

35 <222> (16)...(16)

<223> Xaa = A o L en la posición 16

40 <400> 58

```

45      Met Pro Xaa Tyr His Ala Glu Glu Ala Thr Xaa His Xaa Lys Lys Xaa
      1           5           10           15
      .
  
```

<210> 59

<211> 15

50 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Motivo Proteico 3 del Ejemplo 7

<221> VARIANTE

60 <222> (2)...(2)

<223> Xaa = L o V en la posición 2

<221> VARIANTE

65 <222> (5)...(5)

<223> Xaa = A o I en la posición 5

ES 2 310 652 T3

<221> VARIANTE
<222> (6)...(6)
<223> Xaa = C o M o A en la posición 6
5
<221> VARIANTE
<222> (9)...(9)
<223> Xaa = V o I en la posición 9
10
<221> VARIANTE
<222> (11)...(11)
<223> Xaa = L o G o C en la posición 11
15
<400> 59

20 Pro Xaa Tyr Trp Xaa Xaa Gln Gly Xaa Val Xaa Thr Gly Val Trp
 1 5 10 15

<210> 60
25 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Motivo Proteico 4 del Ejemplo 7

<221> VARIANTE
35 <222> (6)...(6)
<223> Xaa = L o F en la posición 6

<221> VARIANTE
40 <222> (9)...(9)
<223> Xaa = T o Q en la posición 9

45 <400> 60

 His Val Ala His His Xaa Phe Ser Xaa Met Pro His Tyr His Ala
 1 5 10 15

50

55

60

65